

厚生労働科学研究費補助金
地域医療基盤開発推進研究事業

在宅医療患者等における多剤耐性菌の 分離率及び分子疫学解析

(H27-医療-一般-012)

平成29年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 荒川 宜親

平成30(2018)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書

荒川 宜親

在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析 5

II. 分担研究報告書

荒川 宜親

愛知県等で分離された菌株の解析 23

飯沼 由嗣

石川県内の介護施設等入所者由来検体からの耐性菌株の分離と同定、遺伝子解析
(北陸地区での在宅医療及び療養型施設における
多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析) 26

川村 久美子

愛知県内および群馬県内の介護施設等入所者由来検体からの耐性菌株の
分離と同定、遺伝子解析 30

村上 啓雄

岐阜県内の介護施設等入所者における検体採取と菌株解析
(岐阜県内の在宅医療患者および特別養護老人ホームにおける
検体採取と菌株解析) 49

藤本 修平

群馬県内の介護施設等入所者における検体採取
(介護施設等入所者からの検体採取等における方法と研究倫理的
についての検討と整備) 54

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 64

IV. 研究成果の刊行物・別刷 65

平成 29 年度 厚生労働科学研究費補助金

(地域医療基盤開発推進研究事業)

「在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析」

(H27-医療一般-012)

班員等名簿(敬称等略)

研究代表者	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・耐性菌制御学分野	教授
研究分担者 (50音順)	飯沼 由嗣 川村 久美子	金沢医科大学医学部基礎医学系生体防御学 名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学専攻 病態解析学講座 (微生物学研究室)	教授 准教授
	藤本 修平 村上 啓雄	東海大学医学部基礎医学系生体防御学 岐阜大学医学部附属病院副病院長 生体支援センター長	教授 教授
研究協力者 (順不同)	太田 浩敏	岐阜大学医学部附属病院検査部	副技師長
	木村 幸司	名古屋大学大学院医学研究科 分子病原細菌学・耐性菌制御学分野	准教授
	和知野 純一 高橋 英郎 市橋 亮	同 上 社会福祉法人健生会 特別養護老人ホーム 花の苑 医療法人 かがやき 総合在宅医療クリニックグループ	講師 施設長 理事長 代表 院長 院長
	高木 寛治 鳥澤 英紀	医療法人社団 高德会 高木医院 医療法人社団 光成会 鳥澤医院	院長 院長
	三輪 佳行	医療法人 育寿会 MIWA 内科胃腸科 CLINIC	理事長 院長
	宮本 憲治 浦田 士郎	北医療生活協同組合 生協わかばの里 愛知県厚生農業協同組合連合会 安城更生病院	施設長 院長
	木野本 武久 梅田 貴之	同 上 介護老人保健施設あおみ デイサービス/ショートステイ/ 在宅介護支援事業所 プエトルアズール 住宅型有料老人ホーム エステートドールビル小牧	施設長 理事長 理事長
	横山 覚	名古屋大学大学院医学研究科 分子病原細菌学・耐性菌制御学分野	博士課程 学生
	北岡 一樹	同 上	博士課程 学生
	林美智子	名古屋大学大学院医学研究科・ 医療技術学専攻・病態解析学講座	博士課程 学生
	金山 堯人	同 上	修士課程 学生
	金地 玲生	同 上	修士課程 学生
	法月 千尋	名古屋大学大学院医学研究科・ 医療技術学専攻・病態解析学講座	修士課程 学生
	林 謙吾 飯島 杏奈 竹中 瑞季、 紺谷 郁穂	同 上 同 上 名古屋大学医学部保健学科 同 上	修士課程 学生 学部学生 同 上

以上は、研究代表者の研究協力者を記載

各研究分担者の研究協力者の御氏名等は、各分担研究報告書に記載

別添 3

総括研究報告書

在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析

(H27-医療-一般-012)

研究代表者 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／耐性菌制御学分野）

研究要旨：近年、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌やカルバペネム耐性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）などの薬剤耐性菌の急性期医療機関における広がりが国際的に警戒されている。その実態は、我が国では、厚生労働省の院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業等により概ね把握されているものの、介護施設や療養型施設等における各種薬剤耐性菌の状況については不明な点が多い。そこで、平成 27-29 年の 3 年間に、愛知県、岐阜県、石川県、富山県および群馬県の介護施設、療養型施設の入所者および在宅医療患者を対象として、便、喀痰、尿等から分離される ESBL 産生大腸菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)等の 7 種類の薬剤耐性菌の分離を試み、最終年度である平成 29 年度は検体から多く分離された ESBL 産生大腸菌と MRSA について詳細な遺伝学的解析を実施した。その結果、療養型施設や介護施設の入所者、在宅患者から分離される MRSA については、市中感染型 MRSA(CA-MRSA)と院内感染型 MRSA(HA-MRSA)の双方が分離され、特に HA-MRSA に CA-MRSA の染色体の一部が取り込まれたハイブリッド型の MRSA ST764 が異なる複数の施設の入所者等から分離された。一方、ESBL 産生大腸菌については、国内や海外で広範に分離されている国際流行クローン *E. coli* ST131-B2 に属する株が過半を占め、また、それらが保持する ESBL 遺伝子媒介プラスミドの多くが、IncF グループに属し、さらに、媒介される ESBL 遺伝子は、国際的に広く拡散している *bla*_{CTX-M-15} とともに、国内やアジア地域の急性期医療機関でも多く分離される *bla*_{CTX-M-27} の頻度が高い傾向が確認された。以上の結果は、介護施設や療養型施設の入所者、在宅医療患者等でも、急性期医療機関の患者から分離される耐性株と同様な遺伝子型の MRSA や ESBL 産生大腸菌が分離され、施設と急性期医療機関との間での入所者や患者等の行き来などにより遺伝的な性質が同じ薬剤耐性菌株が共有されていることが確認された。

研究分担者（敬称略、50 音順）

金沢医科大学医学部基礎医学系生体防御学・
教授 飯沼由嗣

名古屋大学大学院医学研究科

准教授 川村久美子

岐阜大学医学部附属病院副病院長

生体支援センター長 教授 村上啓雄

東海大学医学部基礎医学系生体防御学・

教授 藤本修平

分子病原細菌学／耐性菌制御学分野

講師 木村幸司

講師 和知野純一

研究協力施設および責任者氏名（敬称略）

社会福祉法人健生会 特別養護老人ホーム

花の苑 施設長 高橋 英郎

医療法人 かがやき 理事長 総合在宅

医療クリニックグループ代表 市橋 亮

医療法人社団 高德会 高木医院

院長 高木寛治

医療法人社団 光成会 鳥澤医院

院長 鳥澤英紀

研究協力者（敬称略）

岐阜大学医学部附属病院検査部

副技師長 太田浩敏

名古屋大学大学院医学系研究科

医療法人 育寿会 理事長 兼
MIWA 内科胃腸科 CLINIC 院長 三輪佳行
北医療生活協同組合 生協わかばの里
施設長 宮本憲治
愛知県厚生農業協同組合連合会
安城更生病院 院長 浦田士郎
同上 介護老人保健施設あおみ
施設長 木野本武久
デイサービス/ショートステイ/
在宅介護支援事業所
プエトルアズール
理事長 梅田貴
住宅型有料老人ホーム
エステートドール小牧
理事長 梅田貴之

A. 研究目的

国内外の医療現場では、1980年代より、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)が徐々に問題となりはじめ、2000年頃よりカルバペネムなどに耐性を獲得した多剤耐性緑膿菌(MDRP)や多剤耐性アシネトバクター(MDRA)、さらに2010年以降カルバペネムを含む広範な抗菌薬に耐性を獲得した腸内細菌科の細菌(CRE)が、急性期医療機関のみならず、市中環境などからも分離されるようになり国際的に大きな関心事となっている。

比較的規模の大きい急性期医療機関における各種薬剤耐性菌の分離頻度などは、医療関係者や研究者の個別的な調査研究とともに厚生労働省の院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)等により、その実態が概ね把握されている。しかし、在宅医療を受けている患者や療養型施設、介護施設等の入所者における、薬剤耐性菌の保菌実態については不明な点が多い。そこで、国内の在宅医療患者や療養施設・介護施設等でケアを受けておられる入所者等における多剤耐性菌の実態を明らかとすることを目的として、平成27年度より平成29年度にかけて、調査研究を実施した。

B. 研究方法

1. 研究実施にあたっての準備

本研究では、在宅医療患者や、療養施設、介護施設などの入所者における、MRSA や

ESBL 産生菌などの7種類の薬剤耐性菌の分離状況とともに、それぞれの耐性株やそれらが保有する耐性遺伝子の遺伝型などを明らかにすることを目的とし、在宅患者や療養施設等入所者より、咽頭拭い液、便、尿などの検体の提供を受ける必要がある。それを可能とするため、研究開始に先立って平成27年度に名古屋大学大学院医学系研究科の「疫学研究専門調査委員会」に研究計画書等を提出し、審査と許可を得て研究を実施した。

2. 研究対象

調査対象者：在宅医療を受けている者および療養型施設、介護施設の入所者で、本人または代諾者により調査研究への協力意思が確認できた者

対象とする多剤耐性菌：国内外の急性期医療機関で分離されることが多く、臨床的に問題視されているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、ペニシリン耐性肺炎球菌(PR(I)SP)、多剤耐性緑膿菌(MDRP)、多剤耐性アシネトバクター(MDRA)、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌及びカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)の7種類の薬剤耐性菌

調査対象の検体：咽頭拭い液、糞便、尿等

3. 耐性菌検出方法

インフォームド・コンセントの手続きを経て、岐阜大学等の協力により在宅患者や入所者等より提供された検体を、直接または数時間増菌培養した後、種々の抗菌薬を含んだ選択培地に塗布し、一夜37°Cで培養後、それぞれの薬剤耐性菌の候補株を分離した。薬剤耐性菌の分離方法は、検体からの耐性菌の分離を担当した名古屋大学、金沢医科大学のグループで共通の方法を採用した。

具体的には、咽頭拭い液については、MRSA、MDRP、MDRA 選択培地および血液寒天平板にスワブを用いて菌を接種し、一夜37°Cで培養後、コロニーの発育の有無を観察した。さらに、血液寒天平板でα溶血を示し、コロニーの形態から肺炎球菌が疑われた場合には、オプトヒンテストを実施した。その後、肺炎球菌と確定したものについてMIC測定を行い、PR(I)SPであるかをCLSIの指定する試験法で判定した。尿、

糞便および褥創滲出液については、MRSA、VRE、ESBL/KPC 産生菌、MDRP、MDRA の各選択培地に検体を接種し、一夜 37°C で培養後、コロニーの発育の有無を観察した。なお、糞便検体については、VRE と ESBL/KPC 産生菌を対象とした増菌培養を行った。

4. 耐性菌確認方法

各々の選択培地で得られたコロニーについては、通常の細菌同定試験法に加え、質量分析装置などを活用して菌種を同定するとともに、ESBL 産生大腸菌については、PCR および PCR 産物の塩基配列のシーケンス解析により β -ラクタマーゼ遺伝子の検出と確認、型別、さらに ESBL 遺伝子媒介プラスミドのレプリコンタイピングを実施した。また、MRSA 株の遺伝的な関連性を確認するため、POT 法と MLST 法等を用いた解析を実施した。

5. 施設入所者等を対象とする研究実施上の留意点の検討

東海大学の藤本教授により、介護施設、療養施設の高齢入所者等を対象とした侵襲性の低い調査研究を実施する上での留意点について、今回の研究調査協力施設に対し研究への協力や実施状況に関しての意見等を求め、検討を実施した。

倫理面への配慮

本研究は、非侵襲的手法での検体の採取による調査研究であるが、名古屋大学の「疫学研究専門調査委員会」で、研究の目的、方法、および研究倫理的な要点について説明を行い、審査を受け、承認が得られた（承認番号 2015-0304）後、各施設において、職員等を対象とした説明会を行い、その後、検体の採取等を開始した。検体提供者に対しあらかじめインフォームド・コンセントを実施し、同意が得られた入所者等より、便、喀痰（咽頭スワブ）および尿の提供を受けたが、検体からの分離株の解析にあたっては、菌株の細菌学的、遺伝学的な解析のみであり、検体提供者の情報等は一切用いず、その点において、研究倫理的な問題は発生しなかった。

C. 研究結果

a. 愛知県等で分離された菌株の解析（荒川宜親、他）

研究代表者である荒川のグループは、藤本のグループや村上のグループと協力しつつ、川村のグループとも連携し、岐阜県内の 1 施設において採取された検体について、7 種類の耐性菌をスクリーニングし、分離株の菌種の同定、薬剤耐性の判定を行った。さらに、本研究全体で得られた薬剤耐性菌のうちグラム陽性球菌を各分担研究者から収集し、*mecA* 等の薬剤耐性遺伝子の確認、および、グラム陽性球菌感染症の治療に用いる主な抗菌薬の MIC の測定を行った。加えて、本研究全体で得られた MRSA について、MRSA-POT 法による分子疫学解析を行った。その結果、施設入所者、在宅患者等から分離される MRSA は現在、国内で流行している院内感染型に多い SCC*mec* type II と推測される POT93 か、市中感染型に多い SCC*mec* type IV と推測される POT106 がほとんどであった。また、各施設内では同一の POT 型や類似した POT 型を示す株が多く、特定の MRSA 株の施設内伝播が疑われる事例も認められた。

b. 石川県内の介護施設等入所者由来検体からの耐性菌株の分離と同定、遺伝子解析（北陸地区での在宅医療及び療養型施設における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析）（飯沼由嗣、他）

石川県内の介護療養型老人保健施設と特別養護老人ホームにおいて調査研究を行った。前者の施設では、74 名の入所者における MRSA と ESBL 産生菌の分離率は、それぞれ、12.2% と 21.6% であった。後者の施設では、34 名の入所者における MRSA の分離率は 2.9%、ESBL 産生菌の分離率は 11.8% であった。しかし、両施設とも、VRE、MDRP、MDRA は分離されなかった。分離された ESBL 産生菌 21 株はすべて大腸菌であり、CTX-M 遺伝子別では、CTX-M-1 Group: 10 株、CTX-M-2 Group: 1 株、CTX-M-9 Group: 10 株となった。また ST131 であると推定された株が 17 株（81%）と大多数を占めた。

c. 愛知県内および群馬県内の介護施設等入所者由来検体からの耐性菌株の分離と同一、遺伝子解析(川村久美子、他)

川村のグループは平成 27 年 11 月から平成 29 年 3 月間に愛知県、岐阜県、石川県、富山県、群馬県の合計 356 名の施設入所者等から採取した 802 検体より分離された 39 株の MRSA と 96 株 (96/802, 11.97%) の ESBL 産生菌の詳しい遺伝子解析を実施した。ESBL 産生菌検出は、咽頭拭い液 2/278 (0.72%)、尿 29/234 (12.39%)、糞便 65/258 (25.19%)であり、糞便からの分離率が最も高かった。ESBL 関連遺伝子型の内訳は、ESBL 産生大腸菌 90 株では CTX-M-3 (6 株)、CTX-M-15 (20 株)、CTX-M-55 (2 株)、CTX-M-2 (1 株)、CTX-M-14 (22 株)、CTX-M-24 (3 株)、CTX-M-27 (33 株)、CTX-M-65 (2 株)、CTX-M-134 (1 株)であった。*K. pneumoniae* 5 株では CTX-M-3 が 2 株、CTX-M-14 が 2 株、CTX-M-27 が 1 株で、*P. mirabilis* では CTX-M-2 が 1 株であった。

また、ESBL 産生大腸菌について POT 法と PFGE により、分離株間の重複を除き、遺伝学的に関連がないと考えられた 59 株を選んだ。これら菌株の保菌者と非保菌者について、性別、年齢、直近三ヶ月以内の抗菌薬投与歴、入院歴の 4 つのリスク因子について、統計解析を実施した結果、直近三ヶ月以内の入院歴の有無で統計学的有意差($P=0.03$)が認められた。分子生物学的特徴では、ESBL 産生大腸菌 59 株の MLST 解析では、ST131、ST38、ST405 など 7 つの ST 型が確認された。59 株中、49 株は ST131、系統発生群 B2 であり、うち 44 株 (74.6%)が O25b であった。この世界流行クローンが占める割合は、健常人由来株の 4 倍、臨床分離株の 2 倍に相当しており、非常に高い値であった。また、ST131 株における *fimH* 遺伝子のサブクラスは、47 株が H30R であり、CTX-M-15 の遺伝子保有株が H30Rx、CTX-M-27 の遺伝子保有株は H30-nonRx であった。*bla_{CTX-M}* を運ぶプラスミドの解析では、8 株が接合伝達可能であり、形質転換体も 29 株得た。PCR によ

る plasmid replicon type の結果は、4 株を除いて、全てが IncF group となり、うち 24 株が FII, FIA, FIB の multi-replicon type であった。薬剤感受性傾向では、ESBL 産生大腸菌はカルバペネム系抗菌薬およびホスホマイシンに感性を維持していたが、約 9 割がフルオロキノロンに、また約半数が ST 合剤に耐性を示していた。今回の調査で在宅患者や介護保険入所者もその腸管内に ESBL 産生大腸菌を保菌していることが明らかとなった。保菌される菌株の分子生物学的特徴は急性期医療機関での臨床分離株のそれと類似しており、さらに保菌のリスク因子として、直近三ヶ月以内入院歴の有無が明らかとなったことから、施設と医療機関との間での入所者を介した耐性菌の循環が示唆された。

一方、MRSA の解析の結果、SCCmec type II 型が 18 株(46.2%)で type IV 型が 21 株 (53.9%)と、ほぼ同じ割合で検出された。この割合は国内で 2016 年に報告された臨床分離株の比率と一致していた。それら菌株の ST 型は、SCCmec type II 型に属する 18 株中 14 株(77.8%)が ST764、SCCmec type IV 型に属する 21 株が ST1 であり、各 SCCmec type 中におけるこれら ST の優位性が認められた。今回多数検出された ST764 は SCCmec type II 型と type IV 型のハイブリットで、国内では 2013 年に急性期医療機関の臨床分離株からも報告されており、今後の動向を注視する必要があると考える。

この ST764 (CC5)は、エンテロトキシン B をコードする遺伝子を 57.1%の割合で保有しており、SCCmec type IV 型 ST1(CC1)はエンテロトキシン A をコードする遺伝子を 85.7%の割合で保有していた。この傾向も 2016 年の急性期医療機関の臨床分離株の報告と類似しているが、一方、急性期医療機関の臨床分離株では ST1 と ST8 はほぼ同じ割合で検出されるが、在宅由来 MRSA 株では ST1 が優位であり、ST8 の占める割合は低いことが明らかとなった。ST8 は *pvl* 遺伝子を保有することが報告されているが、今回は *pvl* 遺伝子を保有する株は認められなかった。これは ST8 が占める割合は低いこ

と矛盾しない。抗 MRSA 薬に対する薬剤感受性はいずれも維持されており、消毒薬抵抗性株も認められなかった。以上のように、長期療養型介護施設や在宅医療患者が保菌する MRSA は、臨床分離株と同様の傾向を示し、特に日本では SCCmec type II 型では ST764、SCCmec type IV 型では ST1 が優位であることが明らかとなった。次の研究では、MRSA の保菌期間や MRSA に感染症発生の有無と分子生物学的な特徴との関連性など明らかにし、MRSA 保菌の意味を考える必要があると思われる。今後も継続的なサーベイランスを実施し、介護施設における耐性菌保菌率の実態を明らかにするとともに、実践可能な感染対策を構築することが必要であると思われた。

d. 群馬県内の介護施設等入所者における検体採取(介護施設等入所者からの検体採取等における方法と研究倫理についての検討と整備)(藤本修平、他)

在宅、長期療養病床、介護保険施設(介護老人保健施設、特別養護老人ホーム、介護療養型医療施設)における、薬剤耐性菌分離状況の調査に必要な方法について検討した。調査は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」の対象であり、さらに、社会的弱者を対象とするために、「特別な配慮」が必要であると考えた。検体採取を行う施設は、個々に倫理審査を受審することが求められる、研究代表者の施設で一括して審査を行うことで審査の適正化と効率化が両立できると考えた。検体採取を行う施設は「研究機関」であるために、施設の長は、研究に関する倫理並びに研究の実施に必要な知識及び技術に関する教育・研修の機会を設け、自身もそれを受ける必要がある。e-learning 等の活用、研究代表者による研修を行うことで適切な教育・研修が可能と考えた。検体提供者を選定する際の無作為化は、乱数によって無作為化した「ID 表」の利用によって容易に行えることがわかった。検体採取については、鼻腔および咽頭の擦過物採取に一定の苦痛が伴うことがわかった。便の採取は容易であるが、尿の採取には時間と工夫が必要なことがわか

った。咽頭、鼻腔からは主に MRSA が検出されているが、MRSA については、鼻周囲、前額、腋窩、鼠径からの拭き取りでも高い検出率を得ている報告があり、鼻腔、咽頭擦過をこれらで替える方法が検討されるべきと考えた。自然に排出された尿、便の採取、及び、体表擦過物の拭き取りであれば、「侵襲」を伴わないと判断できると考えた。施設特性による標準化を目的とした予備調査においては、ESBL の分離率を従属変数として、喀痰吸引、経管栄養、口腔ケアの介助、移乗介助、おむつ排便率を調べた。7 施設からの回答により、喀痰吸引、経管栄養が正の相関を示した。重回帰分析では、他の変数も影響を与えている可能性が示唆されたが、施設数を増やして検討をする必要があると考えた。

e. 岐阜県内の在宅医療患者および特別養護老人ホームにおける検体採取と菌株解析(村上啓雄、他)

在宅医療患者等における薬剤耐性菌の保有状況調査および分子疫学解析を目的に、岐阜県内の在宅医療提供施設 2 施設および特別養護老人ホーム 1 施設において計 97 名から咽頭拭い液 97 検体、尿 43 検体、糞便 70 検体、褥瘡拭い液 2 検体の計 212 検体を採取した。名古屋大学で実施した耐性菌の分離作業では、VRE、PR(I)SP、MDRP、MDRA、CRE は分離されなかったが、咽頭拭い液の 6.2% で MRSA が、糞便の 32.9% で ESBL 産生菌が、それぞれ分離された。これらは岐阜大学医学部附属病院での検出率と比較し高く、特に ESBL 産生菌の保有率は極めて高率であった。一方、介護施設等に関する既報とは、ほぼ一致するとともに、情報が少ない在宅医療患者においても薬剤耐性菌の保有率が高いことが証明された。以上の結果より、在宅医療患者および療養型施設入所者では、MRSA や ESBL 産生菌など薬剤耐性菌を高率に保有していることが推察され、手指衛生や個人防護具の適切な着用など標準予防策の遵守に関する啓発とともに、各施設における手指消毒剤や個人防護具など必要な資材の準備、適切な配置の推進が必要と考えられた。

D. 考 察

海外では、急性期医療機関のみならず、療養型施設、介護施設等の入所者、さらに、一般市民からも、種々の薬剤耐性菌が分離されており、国際的に大きな関心事となっている。今回の国内の療養型施設、介護施設等の入所者および在宅医療を受けている患者等から分離される薬剤耐性菌、特に分離頻度が高かった MRSA と ESBL 産生大腸菌を対象とした遺伝子解析手法を用いた分子疫学的解析により、MRSA については、市中感染型 MRSA(CA-MRSA)とともに、急性期医療機関に多い院内感染型 MRSA(HA-MRSA)と推定される遺伝型の MRSA も多く分離されることが確認された。この事実は、施設入所者等が急性期病院に受診や入院した際に、そこで HA-MRSA を獲得し、施設に持ち帰っている可能性を示している。また、CA-MRSA もかなりの頻度で確認されたが、この事実は、入所者が市中で CA-MRSA を獲得した場合と、近年、急性期医療機関でも CA-MRSA の分離が増えているという事実から、急性期医療機関に受診あるいは入院した際に、HA-MRSA と同様に CA-MRSA を獲得し、施設に持ち帰ったという2つの可能性が想定された。

今回、複数の異なる施設から MRSA ST764 (SCC*mec* type II)が分離された。ST764 は代表的な HA-MRSA である ST5 に遺伝的に近く、さらに、SCC*mec* type IV を持った市中環境で広がりやすい CA-MRSA の染色体の一部を獲得したハイブリッド型の MRSA であり、抗菌薬の選択圧が低い療養型施設や介護施設などの入所者の間で伝播拡散する可能性もあり、注意と監視が必要な ST 型の一つとなる可能性がある。

介護施設や療養施設の入所者、在宅医療患者等からの ESBL 産生大腸菌については、国際的に流行している *E. coli* ST131-B2 で、*bla*_{CTX-M-15} や *bla*_{CTX-M-27} などの ESBL の遺伝子を媒介する IncF グループに属する伝達性プラスミドを保有する株が多く分離された。*bla*_{CTX-M-15} は世界各地で医療環境や

畜産環境、健常人から広く検出され、*bla*_{CTX-M-27} は、日本を含むアジア地域の医療環境で多く確認されるタイプの ESBL であり、療養施設等の入所者から、*bla*_{CTX-M-15} や *bla*_{CTX-M-27} の遺伝子保有株が多く分離される事実は、MRSA と同様に、療養施設等の入所者等が、急性期医療機関を受診したり入院した際に獲得し、施設に持ち帰った結果と推察される。このことは、今回の研究で ESBL 産生株が分離された入所者と分離されない入所者とに関する疫学的な解析により、直近3ヶ月間の急性期医療機関への入院が ESBL 産生菌獲得のリスクと判定された事実からも支持されるものと考えられる。ただし、ESBL 産生大腸菌は、近年、わが国でも市販鶏肉などの食品や市中で健康な生活を過ごしている健常者からも無視できない頻度で分離されており、必ずしも急性期医療機関のみが ESBL 産生大腸菌の療養型施設等への侵入窓口とは限らないという点は、介護施設や療養型施設における効果的な耐性菌対策の実施をより難しくしていると言えよう。

今回の調査では、MRSA や ESBL 産生大腸菌の分離頻度は施設ごとにかかなりの差が見られたが、分離頻度の高い施設では、遺伝的に類似の耐性株が複数の入所者から分離されていた。この事実は、これらの耐性株が、施設に侵入したのちに、無症状の入所者間に伝播拡散した可能性を示唆している。MRSA や ESBL 産生大腸菌は、一定のレベルの感染防御能力がある入所者の場合は、感染症を発症することは少なく、無症状の保菌者として存在し、周囲の入所者に人知れずに耐性菌をばらまくことが考えられ、介護施設や療養型施設における耐性菌対策のあり方について検討する必要がある。しかし、その対策は、急性期医療機関における厳格な感染拡大防御策とは異なった内容になるものと考えられる。

E. 結 論

平成 27 年度から 29 年度にかけて、愛知県、岐阜県、石川県、富山県、群馬県内の施設の入所者等から分離された MRSA と

ESBL 産生菌について遺伝的な観点から詳しく解析した結果、MRSA については、いわゆる市中感染型と院内感染型の双方が確認された。特に多剤耐性傾向を示す院内感染型 HA-MRSA の染色体に、抗菌薬の選択圧が低い市中で広がりやすい CA-MRSA の遺伝子の一部が取り込まれたハイブリッド型の MRSA ST764(CC5)が、複数の異なる施設の入所者より分離されており、今後、その動向に注目する必要がある。

他方、ESBL 産生大腸菌については、国際流行クローン(*E. coli* ST131-B2)が多く分離され、ESBL 遺伝子を媒介する伝達性プラスミドのレプリコンタイプは IncF グループが主流であり、さらに媒介されている ESBL の遺伝子型は、世界各地から報告される CTX-M-15 型とともに、アジア地域の急性期医療機関や健常者で多く分離される傾向がある、CTX-M-27 が多いことなどが、確認された。

MRSA や ESBL 産生大腸菌が多く分離される施設では、遺伝的に類似した耐性株が複数の入所者から分離される傾向が強く、施設内で入所者間に伝播拡散している可能性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

1. 療養施設、介護施設の一部には、急性期医療機関より ESBL 産生大腸菌の分離率が高い施設が存在することが確認された。
2. 療養施設、介護施設の一部では、同じ遺伝型に属すると思われる MRSA や ESBL 産生大腸菌が、それぞれ複数の入所者等から分離されており、それらの耐性株の施設内伝播が発生していたことが、強く示唆された。
3. 院内感染型の SCCmec type II 型に属する MRSA ST764(CC5)が、複数の異なる施設等

から分離されており、今後、介護施設、療養型施設等での広がりに注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawamura K, Hayashi K, Matsuo N, Kitaoka K, Kimura K, Wachino J, Kondo T, Iinuma Y, Murakami N, Fujimoto S, Arakawa Y.
Prevalence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* B2-O25-ST131 H30R among residents in nonacute care facilities in Japan.
Microb Drug Resist. 2018 May 23. doi: 10.1089/mdr.2018.0068.

2. 学会発表

1. 林謙吾、川村久美子、他 7 名. 在宅医療患者および介護施設入所者等における基質特性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌率およびその分子疫学解析. 第 54 回日本細菌学会中部支部総会(名古屋). 平成 29 年 10 月 13-14 日.
2. 林謙吾、川村久美子、他 7 名. 在宅医療患者および介護施設入所者等における基質特性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌率および分子疫学解析. 第 46 回薬剤耐性菌研究会(群馬). 平成 29 年 11 月 10-11 日.
3. 林謙吾、川村久美子、他 5 名. 愛知県下 3 施設の在宅医療患者等における基質特性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌率および分子疫学解析. 第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術集会(岐阜). 平成 30 年 2 月 9-11 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| その他 | なし |

在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析

分担研究課題：在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析

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／耐性菌制御学分野）

研究要旨 岐阜県内の1施設において採取された検体について、7種類の耐性菌をスクリーニングし、分離株の菌種の同定、薬剤耐性の判定を行った。さらに、本研究全体で得られた薬剤耐性菌のうちグラム陽性球菌を各分担研究者から収集し、*mecA*等の薬剤耐性遺伝子の確認、および、グラム陽性球菌感染症に用いる主な抗菌薬のMICの測定を行った。加えて、本研究全体で得られたMRSAについて、MRSA-POT法による分子疫学解析を行った。今回得られたデータによれば、施設入所者、在宅患者等におけるMRSAは現在、国内で流行している院内感染型に多いSCC*mec* type IIと推測されるPOT93か、市中感染型に多い SCC*mec* type IVと推測されるPOT106がほとんどであった。また、施設内では同一のPOT型や類似したPOT型を持つものが多く、施設内伝播が疑われる事例も認められた。

研究協力者（敬称略）

東海大学医学部基礎医学系生体防御学・
教授 藤本修平
社会福祉法人健生会 特別養護老人ホーム
花の苑 施設長 高橋 英郎
岐阜大学医学部附属病院副病院長
生体支援センター長 教授 村上啓雄
岐阜大学医学部附属病院検査部
副技師長 太田浩敏
医療法人 かがやき 理事長 総合在宅
医療クリニックグループ代表 市橋亮一
医療法人社団 高德会 高木医院
院長 高木寛治
医療法人社団 光成会 鳥澤医院
院長 鳥澤英紀
医療法人 育寿会 理事長 兼
MIWA 内科胃腸科 CLINIC 院長 三輪佳行
北医療生活協同組合 生協わかばの里
施設長 宮本憲治
愛知県厚生農業協同組合連合会
安城更生病院 院長 浦田士郎
同上 介護老人保健施設あおみ
施設長 木野本武久
デイサービス/ショートステイ/
在宅介護支援事業所
プエトルアズール
理事長 梅田貴之
住宅型有料老人ホーム
エステートドール小牧
理事長 梅田貴之

名古屋大学大学院医学系研究科
分子病原細菌学／耐性菌制御学分野
准教授 木村幸司、講師 和知野純一
大学院生 北岡一樹、横山覚、金地玲生、金山
堯人

A. 研究目的

国内外の医療現場では、1980年代より、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）やバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）が徐々に問題となりはじめ、2000年頃よりカルバペネムなどに耐性を獲得した多剤耐性緑膿菌（MDRP）や多剤耐性アシネトバクター（MDRA）、さらに2010年以降カルバペネムを含む広範な抗菌薬に耐性を獲得した腸内細菌科の細菌（CRE）が、急性期医療機関のみならず、市中環境などからも分離されるようになり国際的に大きな関心事となっている。

比較的規模の大きい急性期医療機関における各種多剤耐性菌の分離頻度などは、医療関係者や研究者の個別的な調査研究とともに厚生労働省の院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）などにより、その実態が概ね把握されている。しかし、在宅医療を受けている患者や療養型施設等の入所者における、薬剤耐性菌の保菌実態については不

明な点が多い。そこで、今回、国内の在宅医療患者等における多剤耐性菌の実態を明らかとすることを目的として研究を実施した。

B. 研究方法

1. 研究実施にあたっての準備

今回の研究では、在宅患者や、療養施設、介護施設などの入所者における、MRSA や多剤耐性緑膿菌、ESBL 産生菌、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌など 7 種類の薬剤耐性菌の分離状況とともに、それぞれの耐性株やそれらが保有する耐性遺伝子の遺伝型などを明らかにすることを目的としている。そのため、在宅患者や入所者より、咽頭拭い液、便、尿などの提供を受ける必要があり、それを可能とするため、名古屋大学大学院医学系研究科の「疫学研究専門調査委員会」に研究計画書等を提出し、審査後、承認を得て研究を開始した。

2. 研究対象

調査対象者：訪問診療等により在宅医療を受けている者および療養型施設、介護施設の入所者で、本人または代諾者により調査への協力意思が確認できた者

総被検者：356 人 総検体数：802 件

対象とする多剤耐性菌：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PR (I) SP)、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)、多剤耐性緑膿菌 (MDRP)、多剤耐性アシネトバクター (MDRA)、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌及びカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)

調査対象の検体：咽頭拭い液、鼻腔粘液、糞便、尿、褥瘡、膿

3. 耐性菌検出方法

採取した検体を、直接または数時間増菌培養した後、種々の抗菌薬を含んだ選択培地に塗布し、一夜 37°C で培養後、それぞれの薬剤耐性菌の候補株を分離した。

具体的には、咽頭拭い液については、MRSA、MDRP、MDRA 選択培地および血液寒天平板にスワブを用いて菌を接種し、一夜 37°C で培

養後、コロニーの発育の有無を観察した。薬剤感受性は、MIC を測定して判定した。さらに、血液寒天平板で α 溶血を示し、コロニーの形態から肺炎球菌が疑われた場合には、オプトヒンテストを実施した。その後、肺炎球菌と確定した株について、Disk 拡散法で試験を行い、発育阻止円の直径を参考に PR (I) SP であるか否かを決定した。尿、糞便および褥創滲出液については、MRSA、VRE、MDRP、MDRA、ESBL/KPC 産生菌の各選択培地に検体を接種し、一夜 37°C で培養後、コロニーの発育の有無を観察した。なお、糞便検体については、VRE と ESBL/KPC 産生菌を対象とした増菌培養を行った。

4. 耐性菌確認方法

各々の選択培地で得られたコロニーについては、質量分析や生化学的試験による菌種の同定、Disk 拡散法による耐性の判定を行った。さらに詳細な解析として PCR 法による耐性遺伝子の検出、およびそれぞれの菌種による感染症の治療に用いられる主な抗菌薬の MIC の測定を行った。加えて、MRSA に関しては、MRSA-POT 法による分子疫学解析を行った。

(倫理面への配慮)

非侵襲的方法による検体の採取による調査研究であるが、名古屋大学の「疫学研究専門調査委員会」で、研究の目的、方法、および研究倫理的な要点について説明を行い、審査を受け、承認が得られた (承認番号 2015-0304) 後、各施設において、職員等を対象とした説明会を行い、その後、検体の採取等を開始した。

C. 研究結果と考察

施設Aにおける耐性菌の分離率はMRSAが全検体の4.4%、在宅患者等の7.7%、ESBLが全検体の6.0%、在宅患者等の12%であった。PR (I) SP、VRE、MDRP、MDRA、CREは分離されなかった。

さらなる耐性菌の解析として、まず、本研究全体で得られた薬剤耐性菌のうちグラム陽性球菌の解析を担当した。耐性菌とし

てはMRSAのみが検出されており、PCR法により全て*mecA*遺伝子陽性であった。またVCM、TEICには全株感性であり、VRSAと判定される株は存在しなかった。そして、本研究全体で得られたMRSAに関して、MRSA-POT法を行った。院内感染型に多いSCCmec type IIと推測されるPOT93か、市中感染型に多いSCCmec type IVと推測されるPOT106がほとんどであった。また、地域をまたいで同一のPOT型を持つMRSAはなく、今回の研究では流行性の強い株は見受けられなかった。しかし、同一施設内では同一のPOT型や類似したPOT型を持つものが多く、施設内伝播が疑われる事例があった。

(結 論)

今回の検討では、在宅医療患者のMRSAにおいては、現在、国内で流行している院内感染型に多いSCCmec type IIと推測されるPOT93か、市中感染型に多いSCCmec type IVと推測されるPOT106がほとんどであった。

E. 健康危険情報

今回の調査解析では、在宅患者等におけるMRSAは国内で流行している株と一致する場合も認められた。また、施設内では同一のPOT型や類似したPOT型を持つものが多く、施設内伝播が疑われる事例も認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析

分担研究課題：北陸地区での在宅医療及び療養型施設における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析

研究分担者 飯沼由嗣（金沢医科大学・臨床感染症学・教授）

研究要旨

北陸地区における高齢者施設入所者における多剤耐性菌の分離状況の確認および耐性菌の分子疫学解析を行うことを目的とする。対象とした施設は石川県の介護療養型老人保健施設（K）および富山県の特別養護老人ホーム（Y）の 2 施設である。MRSA の分離率は 12.2%と 2.9%、ESBL 産生菌の分離率は 21.6%と 11.8%であった。CRE（カルバペネム産生菌）、VRE、MDRP、MDRA は分離されなかった。分離された ESBL 産生菌 23 株はすべて CTX-M 産生 *Escherichia coli* であり、CTX-M 遺伝子別では、1G:11 株、2G:1 株、9G:11 株となった。また推定 ST131 の株が 18 株（78%）と大多数を占め、M-1G の 9 株は CTX-M15 を産生する世界流行クローンであった。薬剤感受性ではキノロンの感受性が特に悪く、全体としては遺伝学的に多様性に富む結果となった。MRSA については、市中感染クローンと考えられる株が多く検出され、医療施設からの患者の移動との関連が示唆された。

研究協力者

河合泰宏（金沢医科大学臨床感染症学）

入谷 敦（金沢医科大学高齢医学／講師）

根井仁一（根井クリニック／院長）

河村佳江（金沢医科大学病院中央臨床検査部／主任臨床検査技師）

金谷和美（金沢医科大学病院中央臨床検査部／臨床検査技師）

村 竜輝（金沢医科大学病院中央臨床検査部／臨床検査技師）

A. 研究目的

北陸地区は高齢者が多く、在宅医療を受けているあるいは介護療養型施設に入所している高齢者も多い。また、これらの高齢者が、様々な疾病により急性期医療機関に入院する機会も多く、医療及び介護サービスの枠組みを超えた薬剤耐性菌伝播拡散のリスクとなっている可能性もある。本研究では、北陸地区において在宅医療を受けている患者あるいは介護療養型施設の入所者を対象に、その薬剤耐性菌保有率の調査と分子疫学的解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) 対象

対象施設は、石川県および富山県の高齢者施設とし、それぞれの施設入所者のうち、本研究に同意した入所者を対象とする。なお、同意は、対象者全員から書面による同意を取得し、もし本人からの同意取得が困難な場合には、その保護義務者（代諾者）から同意を取得できた者とする。目標患者数として合計 100 名前後を目指す。また、薬剤耐性菌陽性化と関連する背景因子として、年齢、性別、過去 3 ヶ月以内の入院歴、過去 3 ヶ月以内の抗菌薬投与歴、薬剤耐性菌検出歴について、調査を行う。

2) 調査対象とする多剤耐性菌

MRSA、VRE、PR(I)SP、MDRP、MDRA、ESBL 産生腸内細菌科細菌（ESBL 産生菌）、CRE（カルバペネム耐性腸内細菌科細菌）

3) 調査対象とする検体

咽頭スワブ、便、尿

4) 検体採取

咽頭スワブは、e スワブレギュラーを用いて採取する。便は、キャップサジ付きの採便管を用いて便を十分量採取する。尿は、滅菌採尿コップな

どを利用して、可能な限り皮膚常在菌などの雑菌混入を防ぎ滅菌スピッツに採取する。

5) 薬剤耐性菌分離方法

以下のスクリーニング培地を使用して耐性菌の分離を行う：クロモアガースクリーン培地（MRSA, VRE, MDRP, MDRA, mSuperCARBA）。咽頭スワブでは、MRSA、MDRP、MDRA のスクリーニング培地を使用する。尿及び便では、すべてのスクリーニング培地を用いる。便では更に増菌培養（BGLB）も併用する。咽頭スワブからのペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP/PISP）の分離には血液寒天培地を用い、肺炎球菌が分離された場合に、薬剤耐性の確認を行うこととする。

6) 耐性菌の解析

スクリーニング培地上に菌が発育した場合には、グラム陰性菌では質量分析装置（VITEK MS）による同定検査を行う（石川県医師会検査センターで実施）。肺炎球菌はオプトヒンテスト等を利用し、MRSA はレシチナーゼ試験、マンニト分解反応で黄色ブドウ球菌であることを確認する。耐性菌と考えられた菌は保存し、解析を行う。解析内容としては、耐性遺伝子（メタロ-β-ラクタマーゼ、ESBL 等）やその他病原遺伝子の検出、系統遺伝子解析（phylogenetic type, MLST, PCR-based ORF typing [POT] 他）、薬剤感受性検査を実施する。ESBL 産生菌疑い株については、Cica Geneus[®] *E. coli* POT KIT（関東化学）を利用し、ESBL 遺伝子（CTX-M 遺伝子;1 グループ（G）, 2G, 9G）の検出とゲノタイピングを行う。

倫理面への配慮 「在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率および分子疫学解析」（受付番号 15-40）として金沢医科大学研究倫理審査委員会の審査を受け、承認を得た。

C. 研究結果

1) 対象施設への説明

今年度は、石川県の介護型老人保健施設（K）および富山県の特別養護老人ホーム（Y）の協力を得ることができ、両施設の入所者を対象とした。施設 K の定員は 144 名である（検体採取に係る研究協力者：入谷敦）。また施設 Y は定員 100 名である（検体採取に係る研究協力者：根井仁一）。

2) 同意の取得と検体採取および検査の実施

採取された検体は、研究協力者の河村、金谷、村により、微生物学的検査が行われた。分離された耐性菌の遺伝子解析については、飯沼、河合、村が中心となって、金沢医科大学臨床感染症学実験室にて実施した。なお薬剤感受性検査および詳細な遺伝子解析は、名古屋大学医学部グループ（グラム陽性菌は名古屋大学医学部分子病原細菌学、グラム陰性菌は同病態解析学）で実施した。

3) 施設 K の検体採取状況

74 名から同意を取得することができた（平均年齢 87 歳：72～104 歳、男：女=16：58）。検体数は、尿 70 検体、便 72 検体、咽頭スワブ 69 検体となった。

4) 施設 Y の検体採取状況

34 名から同意を取得することができた（平均年齢 89 歳：67～99 歳、男：女=7：27）。検体数は、尿 30 検体、便 28 検体、咽頭スワブ 1 検体となった。

5) 施設 K の耐性菌分離状況

MRSA は 9 名（12.2%）から分離された。分離された検体は、尿：1 名、便：5 名、咽頭スワブ：5 名、尿及び咽頭スワブ：1 名、便及び咽頭スワブ：1 名であった。9 名中入院歴あり 2 名、抗菌薬投与歴あり 2 名であった。

ESBL 産生菌は、すべて *Escherichia coli* であり、16 名（21.6%）から分離された。分離された検体は、尿：8 名、便：15 名、尿及び便：7 名であった。16 名中入院歴あり 4 名、抗菌薬投与歴あり 5 名であった。

ESBL 産生菌と MRSA がともに分離されたのは、2 名であり、うち 1 名は抗菌薬投与歴があった。

VRE、MDRP、MDRA、CRE（カルバペネマーゼ産生菌）は今回分離されなかった。

6) 施設 Y の耐性菌分離状況

MRSA は 1 名（2.9%）から分離された。分離された検体は咽頭スワブであり、入院歴および抗菌薬等歴があった。

ESBL 産生菌は、すべて *E. coli* であり、4 名（11.8%）から分離された。分離された検体は、尿：1 名、便：4 名、尿及び便：1 名であった。4 名中入院歴あり 2 名（うち 1 名は老人保健施設）、抗菌薬投与歴はなかった。

ESBL 産生菌と MRSA がともに分離された例はなかった。VRE、MDRP、MDRA、CRE（カルバペネマー

ゼ産生菌)は今回検分離されなかった。

7) 分離された ESBL 産生 *E. coli* の遺伝子解析
7-1) Cica Geneus[®] *E. coli* POT KIT を用いた解析

同一人の同 POT 型および感受性がほぼ一致した株の重複を除き、20 名より 23 株が分離された。POT 解析では、CTX-M 遺伝子は M-1G: 11 株、M-2G: 1 株、M-9G: 11 株となった。またゲノム遺伝子系列である MLST と関連する POT1: 49 (推定 ST131) が 18 株 (78%) と大多数を占め、その他 POT1 が 8: 1 株、同 16: 2 株、同 19: 2 株という結果となった。また、施設 K の 1 名から 2 種 (POT1/CTX-M が 49/1G と 19/9G) の ESBL 産生 *E. coli* が分離され、もう 1 名からは同一 POT 型ではあるが感受性の異なる E2 株が分離された。

7-2) 詳細な遺伝子解析

CTX-M 型以外の ESBL 遺伝子は検出されなかった。M-1G の 11 株はすべて POT1: 49 であり、phylogenetic type B2、O25b、MLST 解析で ST131 と判明した。このうち 9 株は CTX-M15 および OXA-1 を産生し、fimH30 および H30-Rx 陽性であり、比較的均一なクローンと考えられた。PFGE 解析によってもこれらの菌株のそれぞれ 3 株からなる類縁クローン 3 組であることが示された (Dice similarity index \geq 85%)。あと 2 株は同一人から検出されており fimH30 陽性、H30-Rx 陰性であった。

M-2G の 1 株は、CTX-M2 を産生し、POT1: 8、MLST 88、phylogenetic type C であり、O25b、fimH30 および H30-Rx は陰性であった。

M-9G の 11 株のうち CTX-M14 産生が 6 株、M27 が 4 株、M65 が 1 株となった。POT1: 49 を示した 7 株はすべて MLST131 と判明し、O25b が 5 株、fimH30 が 6 株であったが、H30-Rx はすべて陰性であった。CTX-M27 産生の 2 株 (ST7844、phylogenetic type A) および M14 産生の 2 株 (ST38、phylogenetic type D)、は O25b、fimH30 および H30-Rx は陰性であった。また M14 産生の 5 株はすべて TEM1 も産生していた。

8) 分離された MRSA の遺伝子解析: Cica Geneus[®] Staph POT KIT (関東化学) を用いた解析

同一人の POT 型が一致した株の重複を除き、10 名より 11 株が分離された。POT1: 106 (推定 SCC_{mec} IV、ST8) の市中感染型クローンと考えられる株が 7 株と最も多く、次に POT1: 93 (推定 SCC_{mec} II、

ST5) の院内型感染クローン (New York/Japan クローン) と考えられた株が 3 株、その他 1 株となった。POT1: 106 の 7 株のうち 4 株が 106-183-34、2 株が 106-183-32 の POT 型となり、これらは比較的類似のクローンと考えられた。

9) ESBL 産生 *E. coli* の薬剤感受性検査 (n=23) (図)

E-test および寒天平板希釈法により抗菌薬に対する MIC を測定した。CAZ のみ両検査法に差が見られた。カルバペネム (IPM、MEPM)、コリスチン (CL)、ホスホマイシン (FOM)、アミカシン (AMK) の感受性は非常に良好であった。一方キノロン (CPFX) の感性率は 17% と極めて悪い結果となった。

D. 考察

石川県 (K) と富山県 (Y) の 2 施設を対象に研究を行い、ESBL 産生菌はすべて *E. coli* であり、20 名から 23 株分離された。分離率はそれぞれ、21.6% (K)、11.8% (Y) であった。また、MRSA については、それぞれ 12.2% (K)、2.9% (Y) の分離率であった。MDRP、MDRA や CRE (カルバペナーゼ産生菌) などのグラム陰性高度耐性菌や VRE は今回検出されなかった。大阪北摂地区での急性期病院入院患者および高齢者施設入所者の CRE 保菌率は 12.2% であり、高齢者施設入所者が 14.9% と急性期病院の 3.6% よりも有意に高い結果が報告されている (Yamamoto Y, et al. J Hosp Infect, 2017)。現時点で北陸地区の高齢者施設における CRE 保菌率は非常に低いものと推測されるが、今後の動向には注意を払う必要がある。

高齢者施設における ESBL 産生菌の分離については、近畿地区の 1 施設 (介護老人保健施設) での検討では、便中の保菌検査では 21.5% で ESBL 産生 *E. coli* が陽性であったと報告されている (山本ら, 日医老誌, 2011)。別の、近畿地区の 3 施設の検討では、便中の ESBL 産生菌の分離率は 21.7% であり、*E. coli* が 93.2% と大多数を占める結果であった (Luvsansharav, et al. Infect Drug Resist, 2013)。また、岩手県盛岡二次医療圏の介護保険施設 3 施設の検討では、便中の ESBL 産生菌の分離率は 9.3% であった。北陸地区の検討では、ESBL 産生菌 (すべて大腸菌) の分離率は、過去の報告 (10~20%) とほぼ同等であり、高齢

者施設における平均的な数値と考えられた。

本研究で検出された ESBL 産生菌はすべて *E. coli* であり、耐性遺伝子もすべて CTX-M 型であった。高齢者施設入所者における主要なクローンとなっていると推測される。MLST、耐性遺伝子および系統遺伝子の解析では、ST131 が 18 株 (78%) を占め、M-1G の 9 株は ST131、CTX-M15 および OXA-1 産生、phylogenetic type B、O25b、H30-Rx の多剤耐性を示す世界流行クローンであった。PFGE 解析においても比較的均一なクローンと考えられ、施設内伝播リスクの高い株と推測された。M-9G 産生 11 株のうち 7 株が ST131 であり、O25b が 5 株、fimH30 が 6 株であったが、H30-Rx はすべて陰性であった。ESBL 産生菌の多様性を示す結果と言える。

MRSA については、ESBL 産生菌よりも分離率は低く、POT1:106 (推定 SCCmec IV、ST8) の市中感染クローンと考えられる株が最も多く検出された。2014 年～2015 年に九州大学病院において主に入院患者から分離された MRSA の解析では、SCCmec II:IV=55:101 であり、やはり IV 型優位であった (Mitsumoto-Kaseida F. et al. J Infect Chemother, 2017)。分離状況の類似性より、医療機関と高齢者施設における患者の移動との関連が示唆された。

E. 結論

北陸地区の高齢者施設においては、MDRP や CRE

などのグラム陰性高度耐性菌は検出されず、ESBL 産生菌の分離率は本邦の既報と同程度であった。検出された ESBL は遺伝学的な多様性が見られたが、ST131 CTX-M15 O25b の流行クローンの集簇が確認され、施設内伝播のリスクが高い株と推測された。

MRSA の分離率は ESBL 産生菌よりも低く、院内感染型クローン (New York/Japan clone) よりも、市中感染型クローンが多い結果となった。近年の急性期病院での分離状況と類似していることより、医療機関と施設間での患者の移動との関連が示唆された。

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

(予定も含む。)

1. 特許取得

なし

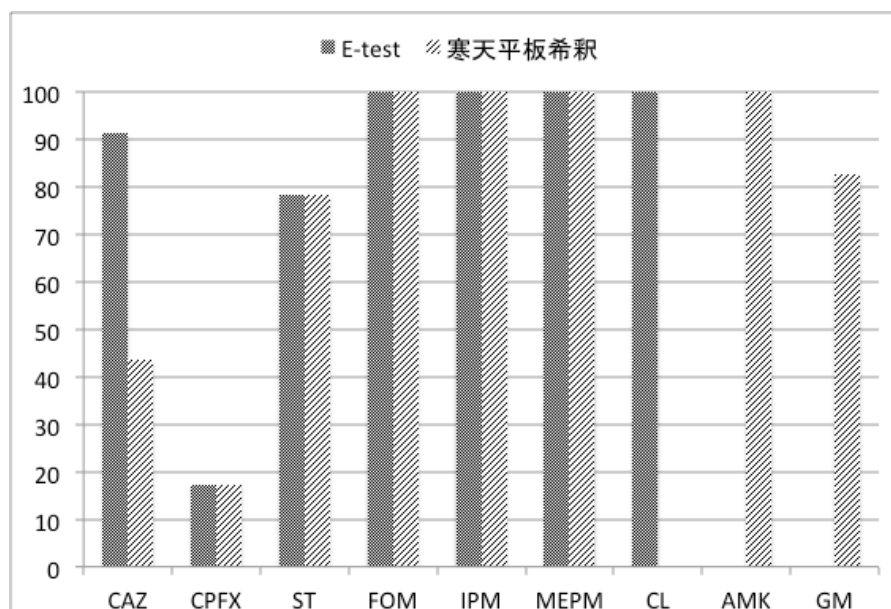
2. 実用新案登録

なし

3. その他

図 ESBL 産生 *E. coli* の薬剤感受性検査 (感率率)

(CL は E-test のみ、AMK と GM は寒天平板希釈法のみ実施、感受性の判定は CLSI2012 の基準で実



在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析

分担研究課題：在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析

研究分担者 川村 久美子（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・病態解析学講座）

研究要旨 国内の在宅医療患者および介護施設入所者における多剤耐性菌保菌の実態を明らかとすることを目的とし、調査研究を行なった。平成 27 年 11 月から 29 年 3 月間に 356 名から収集した 802 検体から、39 株(39/802, 4.86%)の MRSA と 96 株 (96/802, 11.97%) の ESBL 産生菌(*Escherichia coli* 90 株、*Klebsiella pneumoniae* 5 株、*Proteus mirabilis* 1 株)を分離した。本学は ESBL 産生菌の解析を担当した。ESBL 産生菌の検出状況を材料別にみると、咽頭拭い液 2/278 (0.72%)、尿 29/234 (12.39%)、糞便 65/258 (25.19%)であり、糞便からの分離率が最も高かった。ESBL 関連遺伝子型の内訳は、ESBL 産生大腸菌 90 株では CTX-M-3 (6 株)、CTX-M-15 (20 株)、CTX-M-55 (2 株)、CTX-M-2 (1 株)、CTX-M-14 (22 株)、CTX-M-24 (3 株)、CTX-M-27 (33 株)、CTX-M-65 (2 株)、CTX-M-134 (1 株)、*K. pneumoniae* 5 株では CTX-M-3 が 2 株、CTX-M-14 が 2 株、CTX-M-27 が 1 株、*P. mirabilis* では CTX-M-2 が 1 株であった。

最終年度である 29 年度は、ESBL 産生菌の腸管内保菌率と菌株の分子生物学的特徴を、健常人由来株や臨床分離株と比較検討した。POT 法と PFGE により、糞便由来株間の重複を除いた結果、遺伝学的に関連がない 59 株を得た。これら菌株の保菌者と非保菌者について、性別、年齢、直近三ヶ月以内の抗菌薬投与歴、入院歴の 4 つのリスク因子について、統計解析を実施した結果、直近三ヶ月以内の入院歴の有無で統計学的有意差($P = 0.03$)が認められた。分子生物学的特徴では、ESBL 産生大腸菌 59 株の MLST では、ST131、ST38、ST405 など 7 つの ST 型が得られた。59 株中、49 株は ST131、系統発生群 B2 であり、うち 44 株(74.6%)が O25b であった。この世界的流行クローンが占める割合は、健常人の 4 倍、臨床分離株の 2 倍に相当しており、非常に高い値であった。また、ST131 株における *fimH* 遺伝子のサブクラスは、47 株が H30R であり、CTX-M-15 保有株が H30Rx、CTX-M-27 保有株は H30-nonRx であった。*bla*_{CTX-M} を運ぶプラスミドの解析では、8 株が接合伝達可能であり、形質転換体も 29 株得ることができた。PCR にて、これらの plasmid replicon type を決定したところ、4 株を除いて、全てが IncF group となり、うち 24 株が FII, FIA, FIB の multi-replicon type であった。薬剤感受性傾向では、カルバペネム系抗菌薬およびフォスホマイシンに感性を維持していたが、約 9 割がフルオロキノロンに、また約半数が ST 合剤に耐性を示していた。今回の調査で在宅患者や介護保険入所者もその腸管内に ESBL 産生大腸菌を保菌していることが明らかとなった。保菌される菌株の分子生物学的特徴は臨床分離株のそれと類似しており、さらに保菌のリスク因子として、入院歴の有無が関係していることが明らかとなったことから、施設と医療機関の間での耐性菌の循環が示唆された。

MRSA の追加解析の結果、SCC*mec* type II 型が 18 株(46.2%)と IV 型が 21 株(53.9%)と、ほぼ同じ割合で検出されていた。この割合は国内の臨床分離株の

2016年の比率と一致していることが明らかとなった。それら菌株のST型は、SCCmec type II型に属する18株中14株(77.8%)がST764、SCCmec type IV型に属する21株がST1であり、各SCCmec typeにおけるこれらSTの優位性が認められた。今回多数検出されたST764はSCCmec type II型とIV型のハイブリットで、2013年臨床分離株からの検出が報告されている。臨床分離株からも検出されており、今後の動向を注視する必要があると考える。このST764 (CC5)は、エンテロトキシンBをコードする遺伝子を57.1%の割合で保有しており、SCCmec type IV型 ST1(CC1)はエンテロトキシンAをコードする遺伝子を85.7%の割合で保有していた。この傾向も2016年の臨床分離株の結果と類似しているが、一方、臨床分離株ではST1とST8はほぼ同じ割合で検出されるが、在宅由来MRSA株ではST1が優位であり、ST8の占める割合は低いことが明らかとなった。ST8はpvl遺伝子を保有することが報告されているが、今回はpvl遺伝子を保有する株は認められなかった。これはST8が占める割合は低いことと矛盾しない。抗MRSA薬に対する薬剤感受性はいずれも維持されており、消毒薬抵抗性株も認められなかった。以上のように、長期療養型介護施設や在宅医療患者が保菌するMRSAは、臨床分離株と同様の傾向を示し、特に日本ではSCCmec type II型ではST764、SCCmec type IV型ではST1が優位であることが明らかとなった。次の研究では、MRSAの保菌期間やMRSAに感染症発生の有無と分子生物学的な特徴との関連性など明らかにし、MRSA保菌の意味を考える必要があると思われる。今後も継続的なサーベイランスを実施し、介護施設における耐性菌保菌率の実態を明らかにするとともに、実践可能な感染対策を構築することが必要であると思われた。

研究協力者

1. 北医療生活協同組合 生協わかばの里・施設長・宮本憲治
2. 愛知県厚生農業協同組合連合会介護老人保健施設あおみ・施設長・木野本武久
3. 住宅型有料老人ホームエステートドゥービル小牧・理事長・梅田貴之
4. 医療法人 かがやき 総合在宅医療クリニック グループ代表・市橋亮一
5. 高德会 高木病院・院長・高木寛治
6. 同朋会 椿野苑・理事長・井上悟
7. 特別養護老人ホーム花の苑・施設長・高橋英郎
8. 石川県介護療養型老人保健施設
9. 富山県特別擁護老人ホーム

A. 研究目的

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、さらにはカルバペネムなどに耐性を獲得した多剤

耐性緑膿菌(MDRP)や多剤耐性アシネトバクター(MDRA)などの多剤耐性菌の臨床現場での蔓延が問題となっている。また、近年では第三世代セファロスポリンをも加水分解できるようになった基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌やカルバペネムを含む広範な抗菌薬に耐性を獲得した腸内細菌科細菌(CRE)が急性期医療機関のみならず、市中環境などからも分離されるようになり大きな関心事となっている。

急性期医療機関で分離される多剤耐性菌の動向については、厚生労働省の院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)などにより把握されつつある。一方で、在宅医療を受けている高齢者や療養型施設入所者については、一定の頻度で多剤耐性菌を保菌している可能性が推定されているが、これまで、国内の疫学調査やサーベイランスはほとんど行なわれておらず、現状その実態は明らかになっていない。海外の調査では、

療養型施設入所者が耐性菌のリザーバーとして、急性期医療機関へ耐性菌を持ち込む可能性を指摘されており、保菌リスク調査も積極的に行なわれている(J Antimicrob Chemother 2011; 66: 297-303; J Antimicrob Chemother 2013; 68: 2686-2688; Int J Antimicrob Agents 2017; 50: 649-656)。そのような状況の中、我国もようやく、2016年に厚生労働省が提示した「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」に従い、介護分野のサーベイランスが行なわれるようになり、在宅医療サービスや療養型施設で保健サービスを受けておられる方々の多剤耐性菌の保菌状況を把握することとなった。今回の調査では、5県9施設の在宅医療患者および介護施設入所者等における多剤耐性菌の保菌調査を行い、その実態を明らかとすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 研究対象

- ・ 対象疾患：在宅医療を受けている者および療養型施設の入所者で、本人または代諾者により調査への協力意思が確認できた者。
- ・ 対象とする多剤耐性菌：MRSA、VRE、PR(I)SP、MDRP、MDRA、ESBL産生菌及びCREの7種類。
- ・ 調査対象の検体：非侵襲的に採取可能な咽頭粘液、鼻腔粘液、糞便、尿、褥創滲出液。

2. ESBL産生大腸菌の分子疫学解析

今年度は、在宅医療患者および介護施設入所者の腸管内に保菌されるESBL産生大腸菌の分子生物学的特徴を解析するために以下の試験項目を実施した。

- ① ESBL関連遺伝子の同定：PCRとその増幅産物のシーケンスにより、CTX-MをはじめとするESBL関連遺伝子を同定した(Antimicrobial Agents Chemother 2006; 50: 791-795; Microb Drug Resist 2017; 23(8): 1059-1066; J Antimicrob Chemother 2009; 63: 72-79; FEMS Microbiol Lett 2000; 184: 53-56)。
- ② O血清型別：PCRによりO25bおよび

O16型を同定した(J Antimicrob Chemother 2008; 61: 1024-1028)。

- ③ 系統発生群の分類：PCRにより6つのphylo-typeに分類した(Environ Microbiol Rep 2013;5: 58-65)。
- ④ multilocus sequence typing (MLST)の同定：7つのhouse-keeping遺伝子のシーケンスを解析することで、ST型を決定した。
(<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>)
- ⑤ 付着線毛*fimH*遺伝子のサブクラスの同定：PCRによりH30/H30-Rxを同定した(MBio 2013; 4: e00377-13; Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 6385-6388)。
- ⑥ 接合伝達実験、形質転換実験ならびにplasmid replicon typeの決定：接合伝達もしくは形質転換によりbla_{CTX-M}を運ぶplasmidを大腸菌DH10Bに移した後、18組のプライマーを用いたmulti-plex PCRにてplasmid replicon typeを決定した(J Microbiol Methods 2005; 63: 219-228)。
- ⑦ PCR-based ORF typing (POT)法ならびにパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による菌株識別：大腸菌POT法(関東化学)による菌株識別を行なうとともに、制限酵素XbaIを用いたPFGEを行い、各施設から分離された菌株の相同性を解析した(Appl Environ Microbiol 2016; 82: 1818-182)。本研究では、POT番号が同一であり、かつPFGEにて85%以上のsimilarityを示す株を相同性ありとした。
- ⑧ 薬剤感受性試験：CLSI勧告法に準じた寒天平板希釈法をおこない、MICの分布を調べた(Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S25, 2015; Clinical and Laboratory Standards Institute. M7-A10, 2015)。なお、チゲサイクリンとコリスチンについては、CLSIにブレイクポイントの基準がないため、EUCASTの基準を用いて判定した。
(http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- ⑨ 統計解析は χ^2 test と Fisher's exact test を使用した。

3. MRSAの分子疫学解析

今年度は、在宅医療患者および介護施設入所者の腸管内に保菌される MRSA の分子生物学的特徴を解析するために以下の試験項目を追加解析した。

- ① Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing : MRSA と同定された菌株について、Zhang らの方法(J Clin Microbiol 2005; 43: 5026-5033)に従い PCR を行い、SCC*mec* type を決定した
- ② Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) : MRSA と同定された菌株について、PFGE を実施した(J Appl Microbiol 2006; 101: 938-947)。菌液をプラグで包埋した後、リゾチーム、リゾスタフィンおよびプロテナーゼ K で細胞壁などの蛋白を分解・除去した。その後、菌のゲノムだけを含むプラグを 30U の *Sma*I で処理し、CHEF DR II (Bio-Red)を用いて電気泳動を行った (泳動バッファーは 50μM チオ尿素を加えた 0.5×TBE、6V/cm、パルス角度 120 度、5.3~34.9sec、20h)。得られた泳動像を、FPQuest (Bio-Rad Laboratories, Inc. Version 5.10)を用いて解析し、最適化 0.0%、トレランス 1.0-1.5%の設定で Dice 法により菌株間の類似係数を算出し、平均距離法 (UPGMA)によりデンドログラムを作製した。バンドパターンの相同性が 85%以上のものを同一クラスターとした。
- ③ 毒素遺伝子の検出 : MRSA と同定された菌株について、7つの毒素遺伝子 (*pvl*, *sea*, *seb*, *sec*, *tst*, *eta*, *etb*)の有無を調べた。*pvl*は McDonald らの方法(J Clin Microbiol 2005; 43: 6147-6149)の改良法にて、*sea*、*seb*、*sec*、*tst*、*eta*、*etb*については Mehrotra (J Clin Microbiol 2000; 38: 1032-1035)らの方法に従い PCR で検出した。
- ④ 薬剤感受性試験 : MRSA と同定された菌株について、寒天平板希釈法を行い (CLSI. 2015. M07-A10)、10 薬剤の Minimum Inhibitory Concentration (MIC)を測定した。培地は Mueller Hinton II Agar (日本ベクトンディキンソン)およ

び Mueller Hinton Broth (DIFCO)、標準菌株として *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 を使用した。薬剤は、oxacillin (OXA) (和光純薬)、cefoxitin (CFX) (シグマアルドリッチ)、daptomycin (DAP) (abcam Biochemicals)、vancomycin (VCM) (和光純薬) teicoplanin (TEIC) (シグマアルドリッチ)、linezolid (LZD) (和光純薬)、arbekacin (ABK) (sequoia research products Ltd)、triclosan (TLN) (和光純薬)、chlorhexidine gluconate (CHX) (和光純薬)、benzalkonium chloride (BZK) (関東化学)を使用した。薬剤感受性結果の判定は、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S27 の基準に従った。

- ⑤ 統計解析は χ^2 test と Fisher's exact test を使用した。

(倫理面への配慮)

名古屋大学の「疫学研究専門調査委員会」で、研究の目的、方法、および研究倫理的な要点について審査を受け、承認 (承認番号 2015-0304) が得られた。承認後、各施設で説明会を行い、その後、本研究を開始した。

C. 研究結果と考察

1. ESBL 産生大腸菌について

平成27年11月から29年3月間に356名から収集した802検体から、39株(39/802, 4.86%)のMRSAと96株 (96/802, 11.97%) のESBL産生菌(*Escherichia coli* 90株、*Klebsiella pneumoniae* 5株、*Proteus mirabilis* 1株)を分離し、このうち、本学はESBL産生菌の解析を担当した。ESBL産生菌の検出状況を材料別にみると、咽頭拭い液 2/278 (0.72%)、尿 29/234 (12.39%)、糞便65/258 (25.19%)であり、糞便からの分離率が最も高かった。施設別では、E施設の0%からC1施設の25.0%と、施設間で分離率に差が認められた。この施設間により検出率の差は、2010年に近畿地

方の3施設で行なわれた調査結果と類似した傾向であった(Infected Drug Res, 2013:6. 67-70)。

次に、ESBL関連遺伝子を解析した。遺伝子型の内訳は、ESBL産生*E. coli* 90株では *bla*_{CTX-M group-1} 保有株が28株(CTX-M-3, 6株; CTX-M-15, 20株; CTX-M-55, 2株)、*bla*_{CTX-M group-2} 保有株 1株、*bla*_{CTX-M group-9} 保有株が61株(CTX-M-14, 22株; CTX-M-24, 3株; CTX-M-27, 33株; CTX-M-65, 2株; CTX-M-134, 1株)、*K. pneumoniae* 5株では CTX-M-3が2株、CTX-M-14が2株、CTX-M-27が1株、*P. mirabilis*では CTX-M-2が1株であった。

最終年度である29年度は、ESBL産生菌の腸管内保有率と菌株の分子生物学的特徴を、健康人由来株や臨床分離株と比較検討した。POT法とPFGEにより、糞便由来株間の重複を除いた結果、遺伝学的に関連がない59株を得た。これら菌株の保有者と非保有者について、性別、年齢、直近三ヶ月以内の抗菌薬投与歴、入院歴などのリスク因子について、統計解析を実施した結果、直近三ヶ月以内の入院歴の有無で統計学的有意差($P = 0.03$)が認められた。また、PFGE解析では、85%以上のsimilarityを示す9つのタイプに分けることができた(図1)。このうち、type I は異なる地域の複数の施設から分離されていることから、介護施設内に比較的定着しやすい菌株であることが示唆された(表1)。一方、type IIは中部地域にある3つの施設から分離されており、その地域に定着した菌株である可能性が推測された。また、同一施設内で、同じタイプの菌株が分離されている事例もあり、施設内感染が生じている可能性も考えられた。

分子生物学的特徴では、ESBL産生大腸菌59株のO血清型別や系統発生群、MLST、plasmid replicon typingなどについて解析を進めたところ、ST131、ST38、ST405など7つのST型が得られた(表2)。このうち、ST131に属する49株は全て系統発生群B2であった。その他、ST38と系統発生群D、ST405と系統発生群Dのように、臨床分離株において、

関連性が報告されている組み合わせが本解析でも認められた。特筆すべき事項としては、世界的流行型であるO25-B2-ST131が菌株の74.6% (44/59株)を占めることが明らかとなったことである。この流行型が占める割合は、健康人の4倍、臨床分離株の2倍に相当しており、非常に高い値である。このO25-B2-ST131に属する44株の主なCTX-M型は、CTX-M-15(11株)、CTX-M-14(9株)、CTX-M-27(23株)であり、この比率は、健康人のそれよりも、むしろ臨床分離株に類似していた。また、ST131株における*finH*遺伝子のサブクラスとCTX-M型の間には、一定の関連性があることが報告されているが(J Antimicrob Chemother 2014; 70: 1639-1649)、今回の結果も既報と同様、CTX-M-15保有株がH30Rx、CTX-M-27保有株はH30-nonRxであった。以上の結果から、在宅医療患者および介護施設入所者においても、その腸管内に一定の割合で世界的流行クローンであるCTX-M-15産生O25-B2-ST131-H30Rx大腸菌および日本国内の臨床分離株で主流となっているCTX-M-27産生O25-B2-ST131-H30Rx大腸菌を保有していることが明らかとなった。このCTX-M-15と-27型は、セフトラジムに耐性傾向を示す進化型である。本調査で日々、抗菌薬に曝露されていない在宅患者および介護施設入所者においても、これら進化型が保有株の多数を占めることが明らかとなった。これらCTX-M-15や-27型保有株は、病原遺伝子も多く保有するとの松村らの報告(J Antimicrob Chemother 2014; 70: 1639-1649)もあり、尿路感染症などの感染症が生じた場合に、治療が困難になる可能性もあり、注意が必要である。

*bla*_{CTX-M}を運ぶプラスミドの解析では、8株が接合伝達可能であり、形質転換体も29株得ることができた。PCRにて、これらのplasmid replicon typeを決定したところ、4株を除いて、全てがInc F groupであり、うち24株がFII, FIA, FIBのmulti-replicon typeであった(表3)。特に、*bla*_{CTX-M-27}を運ぶプラスミドは、25株中22株がFII, FIA, FIBであった。こ

のタイプのプラスミドは、腸管内の安定的な保菌に寄与しているとの報告(Appl Environ Microbiol 2016; 82: 1818-1827)もあり、更なる研究では、ESBL産生菌の保菌期間も同時に調査する必要があると考える。

薬剤感受性試験では、セフトラジジムにより耐性傾向を示す菌株においても、カルバペネム系抗菌薬およびフォスホマイシンに対して感性を維持していた。一方で、約9割がフルオロキノロンに、また約半数がST合剤に耐性を示していた(表4)。フルオロキノロン耐性株のDNAジャイレースのキノロン耐性決定領域を解析した結果、GyrAおよびParCに4つの変異 (S83L, D87Y/GyrAおよびS80I,E84V/ParC変異)を獲得しており、これが高度耐性の原因であることが明らかとなった。また、*bla*_{CTX-M-15}保有株の8割は plasmid性キノロン耐性遺伝子*aac(6')-Ib-cr* 遺伝子も同時に保有しており、既報と同様の傾向であった。CTX-M-14、-15、-27型の間で薬剤感受性傾向をみると、CTX-M-15保有株はセフトラジジムにおいて、CTX-M-27保有株はシプロフロキサシンにおいて、統計的有意をもって高い耐性を示しており、これら菌株による感染症治療の際には、選択する薬剤に注意を要すると思われる。

以上、在宅医療および介護施設入所者の腸管内に保菌される ESBL 産生大腸菌の分子生物学的特徴を明らかにした。ESBL 関連遺伝子の分布、MLST、系統発生群など、いずれも臨床分離株のそれと類似していた。さらに、保菌のリスク因子として、入院歴の有無が関係していることから、施設と医療機関の間での耐性菌の循環が示唆された。今後も継続的なサーベイランスを実施し、介護施設における耐性菌保菌率の実態を明らかにするとともに、実践可能な感染対策を構築することが必要であると思われる。また、介護分野における感染対策には、予算とマンパワーが必要となることから、十分な実態把握をした上で、薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの中で、新たな感染対策案を構築する必要があると考える。

2. MRSA について

参加者 356 人のうち 31 人 (8.7%)から MRSA が分離された。一つの材料からのみ MRSA が検出された人は 23 人、複数の材料から検出された人は 8 人であり、その組み合わせは咽頭拭い液と糞便 (n = 3)、咽頭拭い液と鼻腔粘液 (n = 2)、咽頭拭い液と尿 (n = 2)、糞便と尿 (n = 1)であった。また、直近 3 か月以内の抗菌薬投与歴があったのは 11 人 (35.5%)、入院歴があったのは 5 人 (16.1%)であった。国内の公立介護老人保健施設を対象とした MRSA 保菌調査における保菌率 (1999-2005 年の 7 年間の平均値)は 11.1 (5.0-16.3)%であり(日本環境感染学会誌 2006; 21: 247-253)、この値に比べ本研究の結果は低値であった。一方で、この分離率は市中の一般健常人の保菌率 (0.72%)よりも非常に高い値であり(J Gen Fam Med 2018; 19: 77-81)、今後は高齢者の保菌動向にも目を向ける必要があることが示唆された。

年齢、性別、直近 3 か月以内の抗菌薬投与歴および入院歴の有無と MRSA 保菌率の詳細を示した(表 5)。年齢、性別、入院歴の有無については、MRSA 保菌陽性と陰性の間で統計学的な有意差は認められなかったが、直近 3 か月以内の抗菌薬投与歴が有る参加者における MRSA 保菌率に統計学的な有意差が認められ ($P < 0.05$)、MRSA 保菌の危険因子である可能性が示唆された。薬剤耐性アクションプラン (2016-2020 年実施)では高齢者施設で処方される抗微生物薬の実態を把握する方針が掲げられている。本研究の結果は、抗菌薬使用量の動向調査や抗菌薬適正使用の必要性を裏付けていると考える。

PCR により SCC*mec* type を決定した結果、MRSA 39 株のうち、18 株 (46.2%)が II 型、21 株 (53.9%)が IV 型に分類された。MLST 解析の結果、7 つの ST 型が確認された。SCC*mec* type 別にみると、II 型 18 株のうち 14 株 (77.8%)が ST764、3 株 (16.7%)が ST5、1 株 (5.6%)が ST630 に、IV 型 21 株のうち 14 株 (66.7%)が ST1、

3株 (14.3%)が ST474, 3株 (14.3%)が ST8、1株 (4.8%)が ST380 に分類された。eBURST 解析により ST764 および ST5 は CC5、ST630、ST380 および ST8 は CC8、ST1 および ST474 は CC1 に属していることが明らかとなった (図 2)。以上のように、本研究では II 型と IV 型がそれぞれ 46.2% と 53.9% と、HA-MRSA と CA-MRSA がほぼ同数分離された。これは Osaka らが報告している臨床分離株における HA-MRSA と CA-MRSA の割合と完全に一致しており (J Med Microbiol 2018; 67: 392-399)、1990 年以降、わが国でおきた Genetic shift を色濃く反映するものであった。また、ST 型についても、II 型は CC5 が 94.4% (17/18) と最も多く、CC5 では ST764 が 82.4% (14/17) と優位であり、この傾向は Osaka らの臨床分離株における報告と一致していた (J Med Microbiol 2018; 67: 392-399)。興味深いことに、II 型と IV 型のハイブリットである ST764 が 9 施設中 5 施設から分離された。ST764 は、II 型に属する ST5 が IV 型に属する CA-MRSA から ACME II と SaPI_{inn54} という新しい 2 つの可動式の遺伝要素を獲得してできた新しいハイブリット株で、2013 年に日本で初めて報告されている (Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 1589-1595)。本研究により、院内だけでなく介護施設を含む市中環境においても、この ST764 が広まっている可能性が示唆された。

PFGE を実施した結果、MRSA 39 株は 29 の異なるパターンに分かれた。これらを 85% の相同性で見ると 7 つのクラスターに分けることができ、IV 型/POT1 値 106 の 21 株のうち 17 株がクラスター I~IV に属し、II 型/POT1 値 93 の 17 株のうち 13 株がクラスター V~VII に属していたが、同一クラスター内で II 型と IV 型が混在することはなかった (図 3)。また、2 検体から MRSA が検出された参加者 8 人 (Figure 2 ID 欄の*)のうち 6 人は 2 検体の POT1 値~POT3 値が全て一致し、同一の PFGE パターンを示した。

施設別の MRSA 陽性率および PFGE

パターンをみると、陽性率は 1.7%~10.0% で、平均は 4.9% で施設間差はなかった。また、同一の PFGE クラスターに属する株が 3 施設以上にまたがってみられることはなかった。施設ごとに主流となるクラスターは異なっており、施設 A ではクラスター VII、施設 B はクラスター IV、施設 C はクラスター V、施設 F はクラスター II が多く認められ、施設 A、C、F では、施設内で広がっている可能性が示唆された。

MRSA 39 株すべてにおいて *eta*、*etb*、*pvl* は検出されなかった。*sea* は 17 株 (43.6%)、*seb* は 9 株 (23.1%)、*sec*、*tst* は 5 株 (12.8%) において検出された (Figure 2、Table 6)。Table 6 に SCC*mec* type、CC、ST 別に、毒素遺伝子を保有する株数を示した。SCC*mec* type の間で *sea*、*seb* の保有率に有意差がみられた ($P < 0.05$) (表 6)。また、II 型の ST5 と ST764 間、IV 型の CC1 と CC8 間で、*sea*、*sec*、*tst* の保有においても統計学的有意差が認められた ($P < 0.05$)。本研究では、SCC*mec* type IV に特徴的な毒素 PVL は検出されなかったが、SCC*mec* type ごとにそれぞれ特徴的な毒素遺伝子が検出されることが明らかとなった。ST764 (II 型) では *seb* を、ST1 (IV 型) では *sea* を保有する株が確認され、これは Osaka らの報告 (J Med Microbiol 2018; 67: 392-399) と一致している。Yamamoto らの報告では、*sea* は IV 型 (ST1) がもつ prophage 上に、*seb* は SCC*mec* type II 型に存在する pathogenicity islands 上に各々コードされており (日本化学療法学会雑誌 2004; 52: 635-653)、わが国ではこのような菌株が主流となって広まっている可能性が示唆された。ST との関連性をみると、*seb* の保有については ST5 と ST764 との間で有意差がでなかったものの、ST1 と ST474 が属する CC1 では 88.2% の割合で *sea* を保有するのに対し、ST8 と ST380 が属する CC8 では *sea* を保有している株はなかった。また、CC1 と CC8 に属する ST のうち *sec* と *tst* を保有するのは ST8 のみであり、その割合は 66.7% であった。以上のことから、ST と毒素遺伝子には強い関連性があるこ

とが示唆された。

表 7 に MRSA 39 株に対する抗菌薬および消毒薬の MIC 値の分布を示す。すべての株が、抗 MRSA 薬である VCM、TEIC、LZD、ABK に感性を示したが、DAP において、1 株 MIC 値が 2 µg/mL を示す株があった。これらの結果から、現状 MRSA 感染症の治療薬として用いられる 4 薬剤 (DAP、VCM、TEIC、LZD) に対する感受性は維持されていることが確認された。また、消毒薬 3 剤の MIC は、常用濃度よりも極めて低い値を示していた。SCC*mec* type II 型と IV 型との間で、MIC₅₀、MIC₉₀ を比較すると、ABK、CHX については MIC₅₀、MIC₉₀ の両者で、BZK については MIC₅₀ が II 型の方で高くなる傾向が認められたが、現状、我が国における MRSA の消毒薬抵抗性は深刻なものではないと思われる。消毒効果は使用条件 (濃度、時間、タンパク質などの不活性化物質の有無) で大きく変化するものであるため、今後も厳守な適性使用の遵守が求められる。

(結 論)

在宅医療患者が一定頻度薬剤耐性菌を保有していた。とくに、ESBL 産生菌の保有率は高く、菌株の分子生物学的特徴も臨床分離株に類似していた。これら結果は施設と医療機関の間での耐性菌の循環の可能性を示すものであり、更なる調査の必要性を強く示唆している。この分野における早急な対策が必要である。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

Kawamura K, 他 10 名.

Prevalence of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* B2-O25-ST131 H30R among residents in non-acute care facilities in Japan. *Microbial Drug Resistance* 2018 *in press*.

2. 学会発表

- (1) 林謙吾、川村久美子、他 7 名. 在宅医療患者および介護施設入所者等における基質特性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌率およびその分子疫学解析. 第 54 回日本細菌学会中部支部総会(名古屋). 平成 29 年 10 月 13-14 日.
- (2) 林謙吾、川村久美子、他 7 名. 在宅医療患者および介護施設入所者等における基質特性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌率および分子疫学解析. 第 46 回薬剤耐性菌研究会(群馬). 平成 29 年 11 月 10-11 日.
- (3) 林謙吾、川村久美子、他 5 名. 愛知県下 3 施設の在宅医療患者等における基質特性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌率および分子疫学解析. 第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (岐阜). 平成 30 年 2 月 9-11 日.

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

表 1. 参加 9 施設における ESBL 産生菌の分離状況

Code of LTCFs	Residents screened, <i>n</i>	Residents colonized, <i>n</i> (%)	Species detected (no. of isolates)	<i>E. coli</i> strain ^a (no. of residents colonised)
A	36	11 (30.6)	<i>E. coli</i> (11)	I (1), III (6), IV (1)
B	72	15 (20.8)	<i>E. coli</i> (15)	I (1), VI (2), VII (3), VIII (2), VIX(2)
C	38	8 (21.1)	<i>E. coli</i> (7) <i>K. pneumoniae</i> (1)	II (3), IV (1)
D	28	4 (14.3)	<i>E. coli</i> (4)	
E	1	0	-	
F	31	3 (9.7)	<i>E. coli</i> (3)	
G	20	8 (40.0)	<i>E. coli</i> (6) <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>P. mirabilis</i> (1)	V (3)
H	21	11 (52.4)	<i>E. coli</i> (11)	I (2), II (1), VIII (1)
I	11	2 (18.9)	<i>E. coli</i> (2)	II (2)
Total	258	62 (24.0)	<i>E. coli</i> (59) <i>K. pneumoniae</i> (2) <i>P. mirabilis</i> (1)	

^a *E. coli* isolates with $\geq 85\%$ similarity results in PFGE analysis were assigned to a distinct strain (I-VIX), as shown in Supplemental Figure 1.

表 2. ESBL 産生大腸菌 59 株における ST 型、系統発生群、ESBL 関連遺伝子、O 血清型、*fimH* サブタイプの関係

ST ^a	Phylotype	ESBL type									<i>fimH</i> type			
		CTX-M-1 group			CTX-M-9 group					CTX-M-2	O25b	<i>H30R</i>		
		CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-55	CTX-M-14	CTX-M-24	CTX-M-27	CTX-M-65	CTX-M-134			<i>H30</i> -non-Rx	<i>H30Rx</i>	
(Number of isolates)														
38 (4)	D (4)				4									
88 (1)	C (1)									1				
131 (49)	B2 (49)	2	11		9	2	23	1	1		44	35	12	
405 (1)	D (1)				1									
1193 (1)	B2 (1)			1										
4891 (1)	B2 (1)			1										
7844 (2)	A (2)						2							
Total (59)		2	11	2	14	2	25	1	1	1	44	35	12	

^aFisher exact test and correction by using the Benjamini-Hochberg procedure were performed for the distribution of STs among different CTX-M isolates, but a statistically significant difference was not observed.

表 3. ESBL 関連遺伝子と plasmid replicon type との関係

Inc type (Number of isolates)	ESBL type								
	CTX-M-1 group			CTX-M-9 group					CTX-M-2
	CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-55	CTX-M-14	CTX-M-24	CTX-M-27	CTX-M-65	CTX-M-134	
FII, FIA, FIB (24)				1		22 ^a		1	
FII, FIA (2)		2							
FII, FIB (1)						1			
FIA, FIB (1)						1			
FII (3)			1	2					
FIA (2)				1		1			
I1 (2)	1		1						
N (1)							1		
Y (1)									1
Total (37)	1	2	2	4	0	25	1	1	1

^a Fisher exact test and correction by the Benjamini-Hochberg procedure were performed for the distribution of plasmid replicon types among different CTX-M isolates, and statistically significant difference was observed in the distribution of replicon types of the plasmids harbouring *bla*_{CTX-M-27} compared with those harbouring *bla*_{CTX-M-14} ($p < 0.05$).

表 4. ESBL 産生大腸菌 59 株の薬剤感受性プロファイル

Antimicrobial agents	Susceptibility profiles (59 isolates)				Resistance rates of each CTX-M type (%)			
	Resistance rates (%)	Range (mg/L)	MIC ₅₀	MIC ₉₀	CTX-M-15	CTX-M-14	CTX-M-27	other types
cefotaxime	100	4 - 256<	128	256<	100	100	100	100
ceftriaxone	100	8 - 256<	128	256<	100	100	100	100
ceftazidime	49.2	0.5 - 64	4	32	90.9*	21.4	48.0	44.4
ciprofloxacin	88.1	≤0.016 - 128	32	64	100	64.3	100**	77.8
amikacin	1.7	0.5 - 32	2	4	0	0	4.0	0
gentamicin	8.5	0.5 - 128	1	4	9.1	7.1	8.0	11.1
imipenem	0	0.063 - 0.25	0.125	0.25	0	0	0	0
meropenem	0	0.008 - 0.125	0.016	0.032	0	0	0	0
trimethoprim/ sulfamethoxazole	27.1	≤0.032/0.6 - 8/152<	0.125/2.38	8/152<	27.3	28.6	32.0	11.1
fosfomicin	0	0.5 - 32	0.5	1	0	0	0	0
tigecycline	0	0.063 - 1	0.25	0.5	0	0	0	0
colistin	0	0.125 - 0.5	0.25	0.25	0	0	0	0

Fisher exact test and correction by the Benjamini-Hochberg procedure were performed to compare the antibiotic resistance rate. The isolates harbouring *bla*_{CTX-M-15} or *bla*_{CTX-M-27} showed significantly higher resistance to ceftazidime or ciprofloxacin, respectively, compared to those harbouring *bla*_{CTX-M-14}; **p* < 0.01 and ***p* < 0.05.

表 5. MRSA 陽性者と陰性者に間での年齢、性別、抗菌薬投与歴、入院歴の比較

	MRSA-positive (n [%])	MRSA-negative (n [%])	<i>P</i> value ^a
Total	31	325	
Age			
< 79	4 (12.9)	63 (19.4)	0.48
80 ≤	27 (87.1)	262 (80.6)	
Gender			
Male	7 (22.6)	89 (27.4)	0.67
Female	24 (77.4)	236 (72.6)	
Use of antimicrobial agents within the last three months			
Yes	11 (35.5)	62 (19.1)	< 0.05
No	19 (61.3)	258 (79.4)	
No data	1 (3.2)	5 (1.5)	
Hospitalization within the last three months			
Yes	5 (16.1)	48 (14.8)	0.79
No	25 (80.6)	276 (84.9)	
No data	1 (3.2)	1 (0.3)	

^a $P < 0.05$ was considered as significant difference.

表 6. SCCmec type、毒素遺伝子、ST および CC の関連性

Toxin	Number of strains (n [%])							<i>P</i> value ^a		
	SCCmec type II			SCCmec type IV				SCCmec type II vs IV	SCCmec type II ST5 vs ST764	SCCmec type IV CC1 vs CC8
	CC5	CC8	CC1	CC8	ST5	ST764	ST630			
ST5 (n=3)	ST764 (n=14)	ST630 (n=1)	ST1 (n=14)	ST474 (n=3)	ST8 (n=3)	ST380 (n=1)				
<i>sea</i>	2 (66.7)	0	0	12 (85.7)	3 (100)	0	0	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>seb</i>	1 (33.3)	8 (57.1)	0	0	0	0	0	< 0.05	0.58	1
<i>sec</i>	3 (100)	0	0	0	0	2 (66.7)	0	0.65	< 0.05	< 0.05
<i>tst</i>	3 (100)	0	0	0	0	2 (66.7)	0	0.65	< 0.05	< 0.05

^a *P* < 0.05 was considered as significant difference.

表 7. 抗 MRSA 薬および消毒薬に対する薬剤感受性傾向

Antimicrobial agents and disinfectants ^a	SCC _{mec} type	Number of isolates at each MIC (μg/mL) of antimicrobials and disinfectants											Number of resistant strains (n [%]) ^b
		≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32≤	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
OXA	II								1	17	32≤	32≤	18 (100)
	IV							1	4	16	32≤	32≤	20 (95.2)
CFX	II							18			8≤	8≤	18 (100)
	IV							21			8≤	8≤	21 (100)
DAP	II				17	1					1	1	1 (5.6)
	IV				21						1	1	0
VCM	II			13	5						≤0.5	1	0
	IV			15	6						≤0.5	1	0
TEIC	II		1	1	12	3	1				1	2	0
	IV			3	13	5					1	2	0
LZD	II			16	2						≤0.5	1	0
	IV			13	8						≤0.5	1	0
ABK	II		1	5	12						1	1	0
	IV		2	19							0.5	0.5	0
TLN	II	18									≤0.125	≤0.125	-
	IV	20	1								≤0.125	≤0.125	-
CHX	II				3	5	10				4	4	-
	IV				12	8	1				1	2	-
BZK	II				1	4	13				4	4	-
	IV				3	15	3				2	4	-

- ^a OXA, oxacillin ; CFX, cefoxitin ; DAP, daptomycin ; VCM, vancomycin ; TEIC, teicoplanin ; LZD, linezolid ; ABK, arbekacin ; TLN, triclosan ; CHX, Chlorhexidine gluconate ; BZK, benzalkonium chloride
- ^b Break points as resistance for each antimicrobial agent; OXA, $4\mu\text{g/mL} \leq B$; CFX, $8\mu\text{g/mL} \leq$; VCM, $16\mu\text{g/mL} \leq$; TEIC, $32\mu\text{g/mL} \leq$; LZD, $8\mu\text{g/mL} \leq$; ABK, $16\mu\text{g/mL} \leq$; Break points as sensitivity for DAP, $\leq 1\mu\text{g/mL}$; In-use concentrations for disinfectants; TLN, 3000-5000 $\mu\text{g/mL}$; CHX, 1000-2000 $\mu\text{g/mL}$; BZK, 500-1000 $\mu\text{g/mL}$

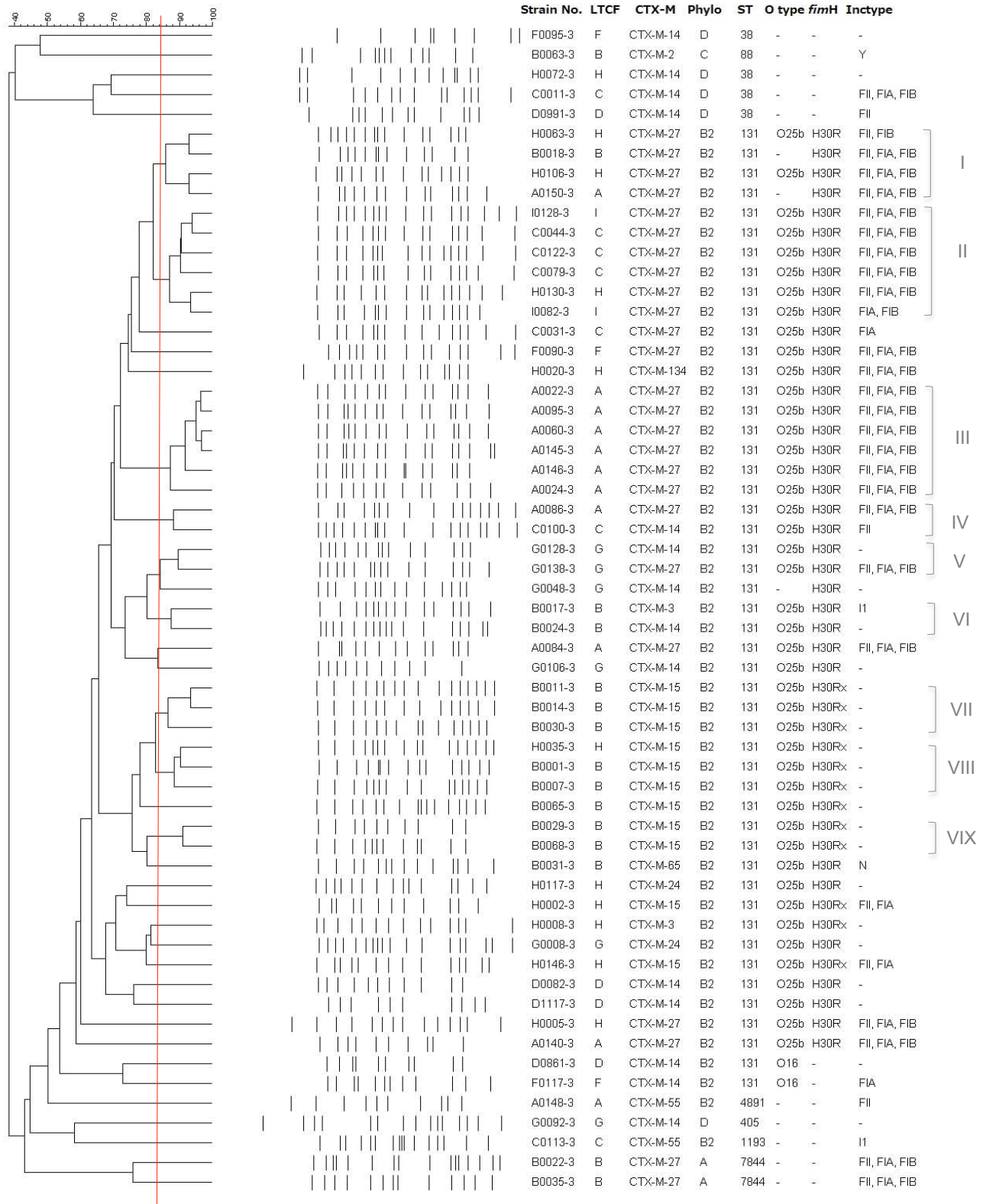


図1. 糞便由来ESBL産生大腸菌59株のPFGE解析

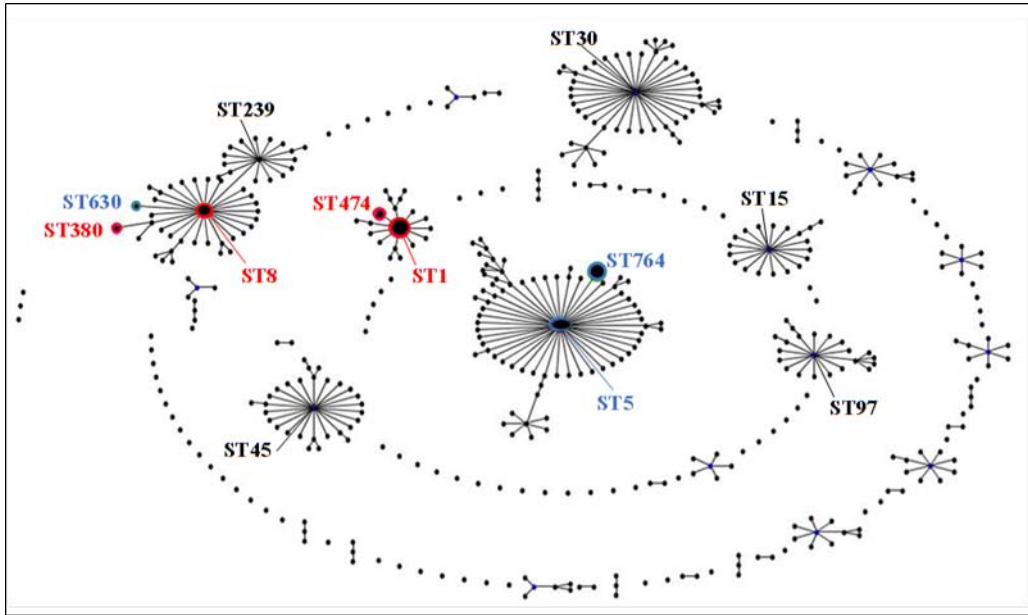


图2. MRSAのeBURST解析

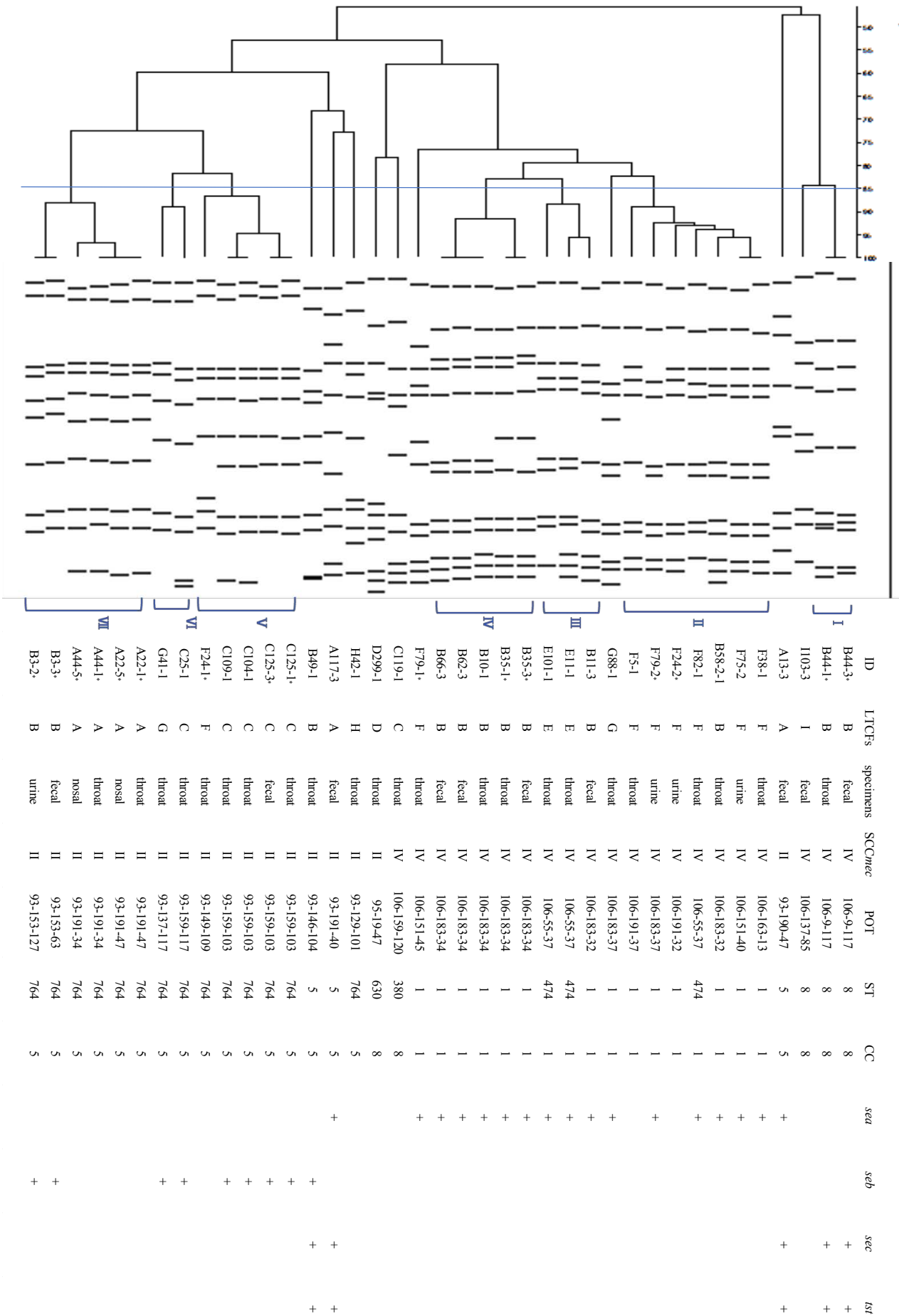


図3. MRSA 39株のPFGE解析

在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析

分担研究課題：岐阜県内の在宅医療患者および特別養護老人ホームにおける
検体採取と菌株解析

研究分担者 村上啓雄

（岐阜大学医学部附属病院生体支援センター センター長・教授）

研究要旨

在宅医療患者等における薬剤耐性菌の保有状況調査および分子疫学解析を目的に、岐阜県内の在宅医療提供施設 2 施設および特別養護老人ホーム 1 施設において計 97 名から咽頭拭い液 97 検体、尿 43 検体、糞便 70 検体、褥瘡拭い液 2 検体の計 212 検体を採取した。VRE、PR(I)SP、MDRP、MDRA、CRE は分離されなかったが、咽頭拭い液の 6.2%で MRSA が、糞便の 32.9%で ESBL 産生菌が、それぞれ分離された。これらは岐阜大学医学部附属病院での検出率と比較し高く、特に ESBL 産生菌の保有率は極めて高率であった。一方、介護施設等に関する既報とは、ほぼ一致するとともに、情報が少ない在宅医療患者においても薬剤耐性菌の保有率が高いことが証明された。以上の結果より、在宅医療患者および療養型施設入所者では、MRSA や ESBL 産生菌など薬剤耐性菌を高率に保有していることが推察され、手指衛生や個人防護具の適切な着用など標準予防策の遵守に関する啓発とともに、各施設における手指消毒剤や個人防護具など必要な資材の準備、適切な配置の推進が必要と考えられた。

研究協力者（敬称略）

岐阜大学医学部附属病院
生体支援センター副センター長・准教授
馬場尚志
岐阜大学医学部附属病院検査部副技師長
太田浩敏
医療法人かがやき理事長
総合在宅医療クリニックグループ代表
市橋亮一
医療法人社団高德会高木医院院長
高木寛治
医療法人社団光成会鳥澤医院院長
鳥澤英紀
特別養護老人ホーム椿野苑施設長
井上祐子
医療法人 育寿会 理事長 兼
MIWA 内科胃腸科 CLINIC 院長
三輪佳行

A. 研究目的

薬剤耐性菌は世界全体の脅威の 1 つとなっている。1980 年代以降、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）やバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）など薬剤耐性グラム陽性菌が問題の中心であったが、近年はこれらに加え基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ（ESBL）産生腸内細菌科細菌や、カルバペネムを含む多くの薬剤に耐性を示す多剤耐性緑膿菌（MDRP）、多剤耐性アシネトバクター（MDRA）、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）などグラム陰性菌における薬剤耐性が大きな問題となっている。さらに、急性期医療施設のみならず、市中環境からも分離されるようになってきており、有効な薬剤耐性菌対策を立案するにあたり、社会全体における分布状況を明らかにする必要性が高まっている。

わが国における各種薬剤耐性菌の分離頻度は、比較的規模の大きい急性期医療機関については個別の調査研究とともに、厚生労働省の院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）などによって概ね把握されている。しかし、在宅医療患者や療養型施設入所者における薬剤耐性菌保菌の実態については不明な点が多い。

そこで、本研究では、岐阜県内の在宅医療提供施設で診療を受けている患者および療養型施設の入所者を対象に、薬剤耐性菌の保有状況に関する調査および分子疫学解析を行い、その実態を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 研究対象

・ 調査対象者：

岐阜県内の在宅医療提供施設 2 施設の患者のうち本研究への同意が文書で得られた患者、および特別養護老人ホーム 1 施設の入所者のうち本人または家族の同意が文書で得られた入所者を対象とした。患者情報としては、年齢、性別、過去 3 か月以内の入院歴および抗菌薬投与歴を調査した。

・ 対象とする多剤耐性菌：

MRSA、VRE、PR(I)SP、MDRP、MDRA、ESBL 産生菌、CRE

・ 調査対象の検体：

咽頭拭い液、糞便、尿等

2. 薬剤耐性菌検出・解析方法

採取した検体を、名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学専攻病態解析学講座に専用の容器で送付し、直接または数時間増菌培養した後、種々の抗菌薬を含んだ選択培地に塗布し、37℃で一夜培養後、それぞれの薬剤耐性菌の候補株を分離した。

具体的には、咽頭拭い液については、MRSA、MDRP、MDRA 選択培地および血液寒天平板にスワブを用いて菌を接種し、37℃で一夜培養後、コロニーの発育の有無を観察した。さらに、血液寒天平板で α 溶血を示し、コロニーの形態から肺炎球菌が

疑われた場合には、オプトヒンテストを実施した。肺炎球菌と確定したものについては MIC 値を測定し、PR(I)SP であるか否かを判定した。尿、糞便および褥創滲出液については、MRSA、VRE、ESBL/KPC 産生菌、MDRP、MDRA の各選択培地に検体を接種し、37℃で一夜培養後、コロニーの発育の有無を観察した。糞便検体については、VRE と ESBL/KPC 産生菌を対象とした増菌培養も実施した。

各選択培地で得られたコロニーについては、菌種同定、PCR および PCR 産物の塩基配列のシーケンス解析により薬剤耐性遺伝子を検出した。ESBL 産生 *Escherichia coli* については、PCR-based ORF Typing (POT) 法による分子疫学解析を行った。

(倫理面への配慮)

名古屋大学の「疫学研究専門調査委員会」での審査および承認後に（承認番号 2015-0304）、岐阜大学大学院医学系研究科倫理審査委員会で同様の審査を受け、承認を得た（承認番号 27-401）。その後、各研究協力施設において職員等を対象とした説明会を行った上で、検体提供者本人または家族の同意を得て検体の採取等を開始した。

C. 研究結果

平成 28 年度中に岐阜県内の在宅医療提供施設 2 施設（A 施設、B 施設）の患者および特別養護老人ホーム 1 施設（C 施設）の入所者から検体を採取した。

施設毎の検出状況

A 施設では、21 名（60～100 歳、平均 80.7 歳、男女比 9：12）から、咽頭拭い液 21 検体、尿 8 検体、糞便 21 検体、褥瘡拭い液 2 検体の計 52 検体を得た。そのうち、咽頭拭い液 21 検体中 1 検体（4.8%）から MRSA が、尿 8 検体中 2 検体（25.0%）および糞便 21 検体中 11 検体（52.4%）から ESBL 産生菌が、それぞれ分離された（表 1）。ESBL 産生菌 13 株中 12 株が *E. coli* であった。ESBL 産生 *E. coli* 12 株を対象とした POT 法による分子疫学解析では、2 株の POT 型

が一致した。VRE、PR(I)SP、MDRP、MDRA、CRE は分離されなかった。

表 1. A 施設における薬剤耐性菌分離状況

	咽頭拭い液 (21 検体)	尿 (8 検体)	糞便 (21 検体)
MRSA	1 (4.8%)	0	0
VRE	0	0	0
PR(I)SP	0	0	0
MDRP	0	0	0
MDRA	0	0	0
ESBL 産生菌	0	2 (25.0%)	11 (52.4%)
CRE	0	0	0

B 施設では、11 名 (76~104 歳、平均 92.3 歳、男女比 5 : 6) から、咽頭拭い液 11 検体、尿 10 検体、糞便 11 検体の計 32 検体を得た。そのうち、糞便 11 検体中 1 検体 (9.1%) から MRSA が、4 検体 (36.4%) から ESBL 産生菌が、それぞれ分離された (表 2)。ESBL 産生菌 4 株中 2 株が *E. coli* であったが、異なる POT 型を示した。VRE、PR(I)SP、MDRP、MDRA、CRE は分離されなかった。

表 2. B 施設における薬剤耐性菌分離状況

	咽頭拭い液 (11 検体)	尿 (10 検体)	糞便 (11 検体)
MRSA	0	0	1 (9.1%)
VRE	0	0	0
PR(I)SP	0	0	0
MDRP	0	0	0
MDRA	0	0	0
ESBL 産生菌	0	0	4 (36.4%)
CRE	0	0	0

今年度は、新たに特別養護老人ホーム (C 施設) での薬剤耐性菌分離状況が明らかになった。C 施設では、65 名 (58~102 歳、平均 85.9 歳、男女比 15 : 60) から、咽頭拭い液 65 検体、尿 25 検体、糞便 38 検体の計 128 検体を得た。そのうち、咽頭拭い液 65

検体中 5 検体 (7.7%) および糞便 38 検体中 1 検体 (2.6%) から MRSA が、糞便 38 検体中 8 検体 (21.1%) から ESBL 産生菌が、それぞれ分離された (表 3)。ESBL 産生菌 8 株中 7 株が *E. coli* であり、2 株の POT 型が一致した。VRE、PR(I)SP、MDRP、MDRA、CRE は分離されなかった。

表 3. C 施設における薬剤耐性菌分離状況

	咽頭拭い液 (65 検体)	尿 (25 検体)	糞便 (38 検体)
MRSA	5 (7.7%)	0	1 (2.6%)
VRE	0	0	0
PR(I)SP	0	0	0
MDRP	0	0	0
MDRA	0	0	0
ESBL 産生菌	0	0	8 (21.1%)
CRE	0	0	0

施設毎の検討では、薬剤耐性菌検出と過去 3 か月の入院歴および抗菌薬投与歴との有意な相関は認められなかった。

岐阜県内 3 施設全体の検出状況

岐阜県内 3 施設全体をまとめると、計 97 名から、咽頭拭い液 97 検体、尿 43 検体、糞便 70 検体、褥瘡拭い液 2 検体の計 212 検体を得た。その中で、咽頭拭い液 97 検体中 6 検体 (6.2%) および糞便 70 検体中 2 検体 (2.9%) から MRSA が、尿 43 検体中 2 検体 (4.7%) および糞便 70 検体中 23 検体 (32.9%) から ESBL 産生菌が、それぞれ分離された (表 4)。

表 4. 3 施設全体での薬剤耐性菌分離状況

	咽頭拭い液 (97 検体)	尿 (43 検体)	糞便 (70 検体)
MRSA	6 (6.2%)	0	2 (2.9%)
VRE	0	0	0
PR(I)SP	0	0	0
MDRP	0	0	0
MDRA	0	0	0
ESBL	0	2 (4.7%)	23 (32.9%)

産生菌			
CRE	0	0	0

3 施設全体で検討すると、薬剤耐性菌検出と過去 3 か月の入院歴とが関連する可能性が示唆された (表 5)。一方、抗菌薬投与歴との有意な相関は認められなかった。

表 5. 薬剤耐性菌検出と 3 ヶ月以内入院歴

		入院歴		計
		あり	なし	
薬剤耐性菌 検出	あり	5	26	31
	なし	2	64	66
	計	7	90	97

オッズ比 (95%信頼区間) : 6.15 (1.12-33.75)

ESBL 産生菌 25 株中 21 株を占めた *E. coli* を対象とした POT 法による解析では、複数の株が同一 POT 型を示したものが 3 型あった (表 6、網掛け部分)。このうち、POT 型 49-56-83 は 2 株とも C 施設由来であったが、49-50-211 は A 施設由来が 1 株、B 施設由来が 1 株、49-58-83 は A 施設由来が 2 株、C 施設由来が 1 株と、異なる施設からの分離菌であった。

表 6. ESBL 産生 *E. coli* 21 株の POT 型

Sample	材料	POT 型 (POT1-2-3)	施設
C0011	便	17-16-007	
C0072	便	17-16-015	
C0113	便	21-05-034	
C0031	便	49-18-067	
C0082	便	49-26-067	
C0146	便	49-37-032	
C0002	便	49-37-160	
C0008	便	49-39-166	
C0005	便	49-48-209	
C0020	便	49-50-211	A 施設
C0128	便	49-50-211	B 施設
C0044	便	49-56-083	C 施設
C0079	便	49-56-083	C 施設

C0106	便	49-58-017	
C0005	尿	49-58-081	
C0130	便	49-58-083	A 施設
C0063	便	49-58-083	A 施設
C0122	便	49-58-083	C 施設
C0117	便	49-60-105	
C0100	便	49-62-107	
C0035	便	49-85-162	

D. 考察

3 施設全体では、咽頭拭い液からの MRSA 検出率が 6.2%、糞便からの ESBL 産生菌検出率が 32.9%であった。2015 年に岐阜大学医学部附属病院検査部細菌検査室に提出された検体では、呼吸器系検体からの MRSA 検出率が 3.8%、糞便からの ESBL 産生菌検出率が 0.58%であり、これらと比較して本研究の対象施設における検出率は高く、特に ESBL 産生菌の保有率は極めて高率であった。一方、POT 法による分子疫学解析では、一部には同一施設から同一 POT 型の株が検出された例があるものの、ほとんどが異なる POT 型を示しており、施設内アウトブレイクを強く疑う結果ではなかった。さらに、異なる施設から同一 POT 型の株が検出される例もみられ、地域に広く分布する株である可能性も示唆された。

わが国の介護保険施設等における ESBL 産生菌の検出状況については、岩手県内の 4 施設における調査において、糞便検体からの ESBL 産生菌の分離率は 4 施設全体で 9.3%、施設毎では 3.4%~21.0%の範囲であったと報告されている (小野寺直人ら, 感染症誌 90:105-112, 2016)。また、兵庫県内の単一施設における調査では、糞便検査を受けた入所者の 21.5%から ESBL 産生菌が検出されたと報告されている (山本章, 日老医誌 48:530-538, 2011)。本研究でも特別養護老人ホーム (C 施設) における糞便からの ESBL 産生菌検出率は 21.1%であり、既報とほぼ同等であった。

在宅医療における実態については、神経難病在宅患者のレスパイト (一時) 入院時に実施した調査で、34.6%の患者から ESBL 産生菌が検出されたとの報告がある (原ら,

環境感染誌 30:183-188, 2015)。この調査では喀痰と尿を検体としているほか、背景疾患に偏りがあるが、本研究での在宅医療提供施設における検出状況を見ると（A 施設：52.4%、B 施設：36.4%）、在宅医療患者も ESBL 産生菌を高率に保有していることが推察された。

このように薬剤耐性菌が高率に検出される状況を鑑みると、在宅医療患者や療養型施設入所者においては、手指衛生や個人防護具の適切な着用を中心とする標準予防策の遵守が極めて重要であると考えられた。

一方、本研究では、施設毎の検討において薬剤耐性菌検出と直近 3 か月間の抗菌薬投与歴および入院歴との有意な相関を認めなかった。しかし、本研究では症例数が不足しているほか、それ以前の抗菌薬投与歴や入院歴については調査していない。この点についてより正確に検討するには、より大規模かつ詳細な調査が必要である一方、国全体で薬剤耐性菌対策として抗菌薬適正使用に取り組んでいる現状を鑑みると、経口薬を含めた抗菌薬の不用意な投与は慎むべきと考えられた。

（結 論）

以上の結果より、在宅医療患者および療養型施設入所者では、MRSA や ESBL 産生菌など薬剤耐性菌を高率に保有していることが推察され、手指衛生や個人防護具の適切な着用など標準予防策の遵守に関する啓発とともに、各施設における手指消毒剤や個人防護具など必要な資材の準備、適切な配置の推進が必要と考えられた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析

分担研究課題：群馬県内の介護施設等入所者における検体採取

（介護施設等入所者からの検体採取等における方法と研究倫理についての検討と整備）

研究分担者 藤本修平（東海大学医学部基礎医学系生体防御学 細菌学/感染症学）
研究協力者 小椋正道（東海大学健康科学部看護学科 老人看護学）

研究要旨

在宅、長期療養病床、介護保険施設（介護老人保健施設、特別養護老人ホーム、介護療養型医療施設）における、薬剤耐性菌分離状況の調査に必要な方法について検討した。調査は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」の対象であり、さらに、社会的弱者を対象とするために、「特別な配慮」が必要であると考えた。検体採取を行う施設は、個々に倫理審査を受審することが求められる。研究代表者の施設で一括して審査を行うことで審査の適正化と効率化が両立できると考えた。検体採取を行う施設は「研究機関」であるために、施設の長は、研究に関する倫理並びに研究の実施に必要な知識及び技術に関する教育・研修の機会を設け、自身もそれを受ける必要がある。e-learning等の活用、研究代表者による研修を行うことで適切な教育・研修が可能と考えた。無作為化は、乱数によって無作為化した「ID表」の利用によって容易に行えることがわかった。検体採取については、鼻腔および咽頭の擦過物採取に一定の苦痛が伴うことがわかった。便の採取は容易であるが、尿の採取には時間と工夫が必要なことがわかった。咽頭、鼻腔からは主にMRSAが検出されているが、MRSAについては、鼻周囲、前額、腋窩、鼠径からの拭き取りでも高い検出率を得ている報告があり、鼻腔、咽頭擦過をこれらで替える方法が検討されるべきと考えた。自然に排出された尿、便の採取、及び、体表擦過物の拭き取りであれば、「侵襲」を伴わないと判断できると考えた。施設特性による標準化を目的とした予備調査においては、ESBLの分離率を従属変数として、喀痰吸引、経管栄養、口腔ケアの介助、移乗介助、おむつ排便率を調べた。7施設からの回答により、喀痰吸引、経管栄養が正の相関を示した。重回帰分析では、他の変数も影響を与えている可能性が示唆されたが、施設数を増やして検討をする必要があると考えた。

A. 研究目的

薬剤耐性菌が地球レベルで問題となるなか、在宅、長期療養病床、介護保険施設（介護老人保健施設、特別養護老人ホーム、介護療養型医療施設）など一定の医療が必要な者に対するサービスにおける薬剤耐性菌の分離状況は本邦ではほとんど明らかになっておらず、薬剤耐性菌の発生、拡散における役割もほとんどわかっていない。本研究では、このような環境における薬剤耐性菌の動向調査を適切に実施する方法を確立するために、実際に特別養護老人ホームにおいて検体採取を行い、その際に必要な、倫理手続き、インフォームド・コンセントの取得、無作為化、実際の検体採取、検体の輸送の方法について、作業中に明らかになった問題、同様の採取を行った他施設からのアンケート調査、文献的な検討を加え検討した。さらに、個人情報保護の立場から、施設特性によってデータの標準化を行う方法について検討した。

B. 研究方法

1. 施設での検体採取

分担研究課題「在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析」の協力施設となっている、社会福祉法人健生会特別養護老人ホーム 花の苑の嘱託医として藤本が検体採取を行った。

2. 「人を対象とする医学研究系研究に関する倫理指針」の在宅等調査への適用についての検討

倫理審査、インフォームド・コンセントの取得の方法について、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」⁽¹⁾ ⁽²⁾（以下、倫理指針）に則った扱いを検討した。

3. 検体採取の方法についての検討

研究代表者より検体採取を依頼した施設に対して、Web アンケートシステムを利用して今回の調査の作業負担、被験者の負担（侵襲性）について意見聴取をおこなった結果⁽³⁾に基づき、苦痛を伴う検体採取に替わる方法について文献的検討を行い「侵襲」を伴わない方法による研究を提案した。

4. 検体の輸送の方法についての検討

上記のアンケートにおいて検体の輸送についての調査を行った。

5. 施設特性の収集と標準化の検討

今回は、検体と個人の対応が提供されない研究であり、今後行われる同様の研究においても、個人情報保護上、同様の方法が取ることが適切と考えた。標準化を施設レベルで行うことを考えた。耐性菌の拡散に影響を与える可能性がある施設の特性を7項目の質問として作成し、研究代表者から検体採取を行った施設に配布、回答を回収した。集計した回答と耐性菌の分離率の関連を検討した。

C. 研究結果と考察

1. 倫理手続

「在宅、長期療養病床、介護保険施設（介護老人保健施設、特別養護老人ホーム、介護療養型医療施設）」（以下「」内を『在宅等』とする）などにおける薬剤耐性菌分離状況調査を行う場合に必要な倫理手続について調査した。

薬剤耐性菌の保有やその分子疫学を調べる研究では、人体から検体を取得することが必要であり、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」の対象となる。

研究の対象の多くが、介護が必要な高齢者であり、また、認知障害を持っており、「社会的に弱い立場にある者」に該当する。このような人については、「研究対象者とする必要性について十分に考慮する」ことが求められる。研究目的から研究対象者とすることは不可避であり、その上で、侵襲の軽減、インフォームド・コンセントの取得などについて十分な配慮をすることが必要である。

a 研究機関の長とその責務

倫理指針において研究機関とは、「研究を実施する法人、行政機関及び個人事業主」とされている。倫理指針の中では、「研究」が何を指すかは示されていないが、「研究対象者」「研究者等」の定義の中に、「研究」が「試料・情報の収集（取得）」を含むことが述べられている。これを「研究」の定義とすると『在宅等』において検体採取にあたる『在宅等』の施設の長（「法人の代表者、行政機関の長又は個人事業主」）は、研究機関の長として責務を負う。

研究の実施には、倫理審査委員会の審査とともに研究機関の長の許可が必要である。「研究機関の長は、実施を許可した研究について、適正に実施されるよう必

要な監督を行うとともに、最終的な責任を負うものとする。」⁽¹⁾とあり、適正な実施のために、「研究の実施のための体制・規程の整備等」の一環として、「研究に関する倫理並びに研究の実施に必要な知識及び技術に関する教育・研修を当該研究機関の研究者等が受けることを確保するための措置を講じなければならない。また、自らもこれらの教育・研修を受けなければならない。」とある。従って、検体採取にあたる『在宅等』の長は、研修などを用意し、自らも受講することが必要になるが、福祉法人などではなじみがないことであるので、研究代表者が研修やe-learningなどの受講方法を用意することが適切であると考えた。

b 文書によるインフォームド・コンセントの取得

検体採取を行う限り、インフォームド・コンセントの取得は不可避である。侵襲を伴わない、介入を行わない研究の場合、口頭による取得が許されている。一方、『在宅等』における研究対象の多くは、認知障害のために、「インフォームド・コンセントを与える能力を欠くと客観的に判断される」者に相当することから、代諾者からのインフォームド・コンセントの取得が必要となる。社会的に弱い立場にある者に対する配慮が必要であることを考えると、代諾者から口頭でインフォームド・コンセントを取得して、研究者側で記録を残すのみでは、必ずしも、十分な配慮が行われているとは言えない。従って、侵襲を伴わない介入を行わない研究であっても、文書によるインフォームド・コンセントを得ることが適切と考えた。

c 代諾者の選定

代諾者は、「研究対象者の意思及び利益を代弁できると考えられる者」でなくてはならない。

一般に、成人の場合、「研究対象者の配偶者、父母、兄弟姉妹、子・孫、祖父母、同居の親族又はそれら近親者に準ずると考えられる者（未成年者を除く。）/研究対象者の代理人（代理権を付与された任意後見人を含む）」が選ばれるが、代諾者と研究対象者の関係を考慮して、「研究対象者の意思及び利益を代弁できると考えられる者が選定されることが望ましい」とされている。

施設の入所者には、家族による虐待が入所の理由の一つになっている場合もある。あるいは、虐待の事実はなくとも、認知症の周辺症状などによって、「厄介な」家族として扱われている場合もあり、

家族が代諾者として適当でない場合も少なからずあると考える。

但し、これらの関係を客観的に評価する、現実的な方法が無いことを考えると、親族等のいわゆる「キーパーソン」(キーパーソンに法的な定義はない。介護において、介護、療養、治療などについて、本人の側の代表者として、介護施設、医療施設などと意志疎通を行い、本人の代わりに方針等の決定にあたる者を指している。家族、親族、法的後見人が、なることが多い。)からインフォームド・コンセントを取得することが現実的な方法と考えた。

これらの「キーパーソン」は、一般に医療、看取りの方法などについての判断を任されており、侵襲の伴わない、介入を行わない研究への参加を承認することに、一定の正当性が有ると考える。

なお、研究計画書には、代諾者の選定についてその方法を記す必要がある。

d インフォームド・アセントの取得

倫理指針では、研究対象者がインフォームド・コンセントを与えることができない場合であって、代諾者からインフォームド・コンセントを得た場合も、可能な限り、研究対象者本人からインフォームド・アセントを得ることが推奨されている。

実際の現場での採取経験からは、多くの認知症老人の場合、不安を除去することに主眼を置くことになるは、やむを得ないと考えた。一方、研究によって社会の役に立つというような内容を、本人の人権に触れずに述べることは、社会的に弱い立場にある対象者に対しては、強要に相当し適切な説明にならないと考えた。

これらの観点からも、精神的侵襲である不安の惹起を含めて、侵襲のない研究方法をとることが重要と考えた。

e 倫理審査

倫理審査は、参加する全ての研究機関が受審する必要がある。前述したように、研究機関には、検体採取を行うそれぞれの医療機関、福祉施設も含まれる。大学等の研究機関と異なり、『在宅等』を担う医療機関、福祉施設で倫理審査受審の経験があることはまれであり、受診の方法を含めて研究代表者が一定の指導を行い、かつ、研究代表者の施設において一括して受審することが適当と考えた⁽³⁾。

2. 検体採取の方法についての検討

今回行った検体の採取の内、鼻腔、咽頭

からの擦過に対して、一定の侵襲があることがわかった。鼻腔については、鼻前庭を、咽頭については口蓋扁桃を擦過することで苦痛が軽減できると考えたが⁽³⁾、どのような検体採取が行われるか理解が困難な研究対象者の場合、顔に手が近づくだけで恐怖を感じることもあり、顔面からの検体採取は、できるだけ避けることが好ましいと考えた。

便検体はおむつなどに自然排泄された便から採取できるため、採取が容易であったが、尿の採取は排泄時に採取する必要があり、工夫(紙コップを尿道口近くに保持する)が必要であった。

咽頭からの分離は、MRSAに限られ、ESBLの分離は無かった。咽頭からのMRSAの分離は、主に鼻腔からの落下と考えた。鼻腔(鼻前庭)擦過物の採取が可能であれば、咽頭擦過物の採取は必ずしも必要ないと考えた。

便からもMRSAが検出されているがこれも鼻腔からの落下と考えた。ESBLは便、尿から検出されており、ほとんどは便、尿から同じ菌株と考えられる菌が分離されていたが、尿からのみ分離された株もあり^(本研究: 川村)、可能であれば、便、尿両方の採取が良いと考えた。

MRSAの分離は鼻腔、咽頭が良いとするものが多いが、皮膚からの分離、特に鼠径(groin, perineum)、腋窩からの分離は、2カ所以上組み合わせることで鼻腔、咽頭とほぼ同等の検出を示し^{(4) (5)}、鼻周囲からの検出率も高い⁽⁶⁾。さらに、スポンジを用いて皮膚を擦過する方法でMRSAを高率に検出する方法が示されている⁽⁷⁾。

顔面でも、開口している鼻、口に較べると額部、頬部は誤操作に伴う危険が少なく、検体採取される場合も、接触されることに対して抵抗感が少ないと考える。

入浴を目的に脱衣をした機会に、額部、頬部、鼻周囲、腋窩、鼠径を1枚のスポンジで軽くぬぐう方法で十分なMRSAを検出できることがわかれば、侵襲無くMRSAの保菌率を調べることができるようになると予測した。今後、検出率についての予備的研究が必要となるが、文献的検討からは、十分に高い検出率が得られると考えた。

3. 検体輸送についての検討

検体採取を担当した研究機関は、必要な細菌学的検査を行うために研究代表者の施設などに検体を送付する。今回は、輸送に冷蔵宅配便を利用した。送付を受ける研究機関も検査専門の機関では無いため、検査、あるいは荷受けができない日が存在し、検体採取、発送の日程調整が必要になった。

余裕のない日常の業務の中での検体採取

であり、また、排泄物の場合、検体が得られるタイミングでの採取であるため、研究室の都合と合わせられない場合も多い。

今後、大きな規模の調査を行う場合は、施設が業務で利用している外注検査会社（検査所）に検体の回収、最初の植菌を依頼できるように、予め当該の検査所にスクリーニング法などについての説明と材料配布、業務契約を行い、研究としての精度を保ちながら、検体採取施設の負担軽減、検査の省力効率化を図ることも選択肢の一つとなるだろう。

4. 施設属性によるデータの標準化についての試み

『在宅等』での調査は、社会的に弱い立場にある人を研究対象とすることから、人権的立場からも個人情報の保護に特に配慮が行われるべきである。

今回は、個人の状態に関する情報の収集は、抗菌薬の使用歴、入院歴など限定されていたが、介護の状態など細かな情報は結合され、個人の特定に至る可能性があり、これを収集し保管することは安全上も好ましくない。

一方、介護現場を見ると、施設によって、医療、介護の程度はかなりのばらつきがあり、「長期療養施設」「介護施設」と言う大きくくりで、耐性菌の発生、拡散、耐性菌の reservoir としての危険を議論することは不適切な可能性があると考えた。

薬剤耐性菌についての調査は、今回の調査を含めて、限られており、このような調査に適した施設情報の収集方法についての報告はない。

今回は、医療機関での薬剤耐性菌拡散のリスクファクターを参考に、藤本と小椋が研究協力者の施設での診療、実習指導経験から、『在宅等』の現状に則し、施設で簡単に回答できる内容に絞った質問票（資料1）を作成し、有用性について検討をした。

7 施設から回答を得た。施設の同定を防ぎ施設情報の保護を図るため、個々の施設に関する情報を隠蔽した上で、耐性菌の分離との相関を見示した（資料2）。

喀痰吸引と口腔ケアに介助を要する者の割合が、ESBL の分離率と相関を示した。重回帰分析を行うと、質問票のそれぞれの項目に意義があるかのような結果が得られる（データ示さず）が、従属変数のデータ数に対する、説明（独立）変数の数が多い（それぞれ7施設、7質問）ことに起因する可

えた。④インフォームド・コンセントは代諾者による必要がある場合が多いことも加味して、文書で行うのが望ましいと考え

能性があり、意味のあるデータを得るためには、施設数を少なくとも50程度に増やす必要があると考えた。

小椋が指摘しているように（資料2）、自明でない命題が含まれたことも散らばりを大きくしたと考える。

経管栄養の率を2分法で2グループに分けると経管栄養が多いグループにESBLの分離率が高いことを有意な差（ $p<0.05$ ）を持って示すことができ（データ示さず）、経管栄養、喀痰吸引、口腔ケアの介助などに一定の関連があることは、これらが、これまで耐性菌拡散のリスクファクターとして挙げられていることを考えた場合、一定の意義があると考えた。

一方、これらのケアが必要な施設利用者は、一般に、咽頭機能に問題があり、誤嚥を繰り返している、あるいは、脳血管障害のために同時に体動不良、膀胱機能障害、意識障害など、肺炎、尿路感染を発症しやすい因子を持っているために、くり返し抗菌薬投与を受けることが多い。従って、この結果を単純にケアによる拡散とするのは誤りと考える。

《全体の考察》

『在宅等』における薬剤耐性菌の分離状況についての調査の方法を検討し、実際の検体採取、検体採取にかかわった施設からの意見聴取、データの解析、データの標準化、解析の高精度化を目的とした施設情報の収集方法の検討、プロトタイプによる施設情報の収集と薬剤耐性菌検出率等の相関解析を行った。

①検体採取時の無作為化については乱数を用いた「ID表」の利用が有用であることが明らかになった。②検体採取では、鼻腔、咽頭からの検体採取が一定の侵襲を伴うことが明らかになり、スポンジによる額、頬、鼻周囲、腋窩、鼠径の連続的な清拭による検体採取によって精神的侵襲を含めて侵襲がないと考えて良いレベルまで侵襲を軽減できる可能性を示したが、今後、検出率についての予備的研究が必要であると考えた。③倫理審査の受審については、検体採取を行う施設、機関は全て研究機関と見なされ、倫理審査、必要な研修を実施する必要があると考えた。大学などとの差を考え、研究代表者の施設が全体を指導し、倫理審査を研究代表者の施設で一括して受審した上で、e-learningなどの研修方法についても研究代表者の施設が手配するのが好ましいと考

た。診療、みとりにおいていわゆる「キーパーソン」が方法を決定をすることが一般的であることを考慮して、代諾者は、一般に親族あるいは法的後見人である「キーパ

ーソン」とするのが適当と考えた。⑤施設属性による標準化については、プロトタイプにおいて命題の自明性が不十分なものが見つかり、修正が必要である。さらに試行における施設数が説明(独立)変数である質問数と同じであり、それぞれの因子の寄与を正しく評価するには施設数が不足していた。施設数を増やしての調査が必要である。

『在宅等』における薬剤耐性菌の分離状況の調査は、始まったばかりであり、全体像を把握するためには、調査対象を増やし、かつ、継続的に行うことが必要である。

今回のわれわれの研究は、今後の調査を適切に行うための研究であり、今後、引き続き、同様の調査を調査対象を広げて行われてゆく助けになると考える。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(文献)

1. 文部科学省, 厚生労働省, 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針, 平成26年12月22日(平成29年2月28日一部改正)(2017)

2. 文部科学省, 厚生労働省, 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針ガイドライン, 平成27年2月9日(平成27年3月31日一部改訂)(平成29年3月8日一部改訂)(平成29年5月29日一部改訂)(2017)
3. 藤本 修平, 在宅医療患者等における多剤耐性菌の分離率及び分子疫学解析, 分担研究課題: 群馬県内の介護施設等入所者における検体採取(介護施設等入所者からの検体採取等における方法と研究倫理についての検討と整備), (2017) 厚生労働科学研究費補助金(地域医療基盤開発推進研究事業) 平成28年度分担研究報告書
4. **Chipolombwe, J., Torok, M. E., Mbelle, N., and Nyasulu, P.** "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* multiple sites surveillance: a systemic review of the literature.", (2016) *Infect Drug Resist*, **9**, 35-42.
5. **Matheson, A., Christie, P., Stari, T., Kavanagh, K., Gould, I. M., Masterton, R., and Reilly, J. S.** "Nasal swab screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--how well does it perform? A cross-sectional study.", (2012) *Infect Control Hosp Epidemiol*, **33**, 803-8.
6. **Kim, S. H., Tan, K. L., Lee, S. Y., Kim, D. W., Shin, S., and Jin, H. R.** "Effect of chlorhexidine pretreatment on bacterial contamination at rhinoplasty field.", (2016) *Springerplus*, **5**, 2116.
7. **Lee, C. S., Montalmont, B., O'Hara, J. A., Syed, A., Chaussard, C., McGaha, T. L., Pakstis, D. L., Lee, J. H., Shutt, K. A., and Doi, Y.** "Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization using sponges.", (2015) *Infect Control Hosp Epidemiol*, **36**, 28-33.

(資料 1)

施設特性についてのご質問

貴施設名： _____

ショートステイの方は含めずに、検体採取をお願いした時の状況をお答え下さい。

1. 貴施設の利用者数は何名でしたでしょうか（おおよその人数で結構です）。

A. _____ 人

2. 当時の貴施設の様式をお答え下さい（該当する方に○をつけて下さい）。

① ユニット型（全室個室で10人程度のユニットで生活）

② それ以外（一部ユニット型を含む）

3. 日常的に喀痰吸引処置が必要な利用者のおおよその人数をお答え下さい。

A. _____ 人

4. 経管栄養（胃瘻）を行っている利用者のおおよそ人数をお答え下さい。

A. _____ 人

5. 日常の口腔ケアで職員によるブラッシング、口腔清拭が必要だった利用者のおおよその人数をお答え下さい。

A. _____ 人

6. 移乗に介助を要する利用者のおおよその人数をお答え下さい。

A. _____ 人

7. 大便の排泄を主にオムツ上で行っている利用者のおおよその人数をお答え下さい。

A. _____ 人

ご協力ありがとうございました。

(資料 2)

在宅班報告書

介護施設の特性と ESBL 産生菌検出率の関係について

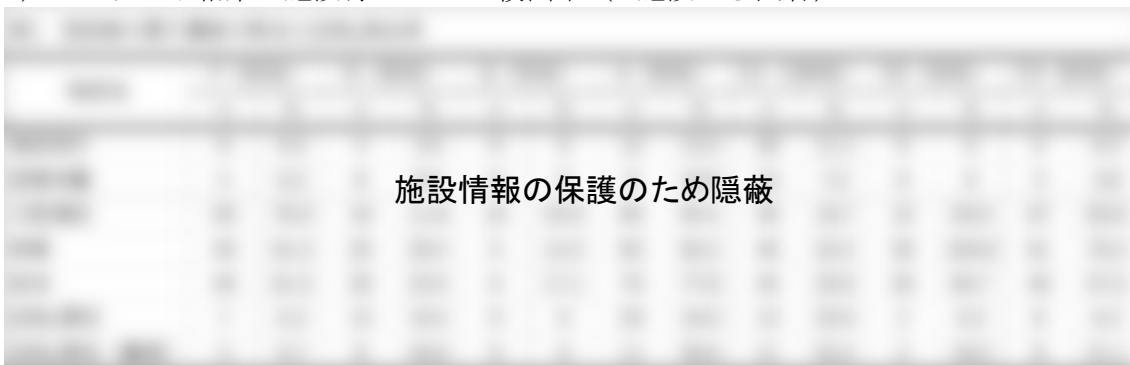
各グループの中間報告の結果を踏まえ、介護施設から検出される多剤耐性菌の検出率にばらつきが見られたことから、介護施設の設備や利用者特性が大きく異なる可能性があると考えられた。そこで、介護施設に簡単なアンケートを行い、多剤耐性菌の検出率と介護施設の特性の違いを調査した。

1. アンケート内容と結果

1) 各施設に行ったアンケート項目

Q1	おおよその施設の利用者数
Q2	施設の様式 ①ユニット型 ②それ以外 (一部ユニット型を含む)
Q3	おおよその喀痰吸引を要する利用者の数
Q4	おおよその経管栄養介助を要する利用者の数
Q5	おおよその口腔ケア介助を要する利用者の数
Q6	おおよその移乗介助を要する利用者の数
Q7	おおよその主にオムツ上排泄を行っている利用者の数

2) アンケート結果と施設毎の ESBL 検出率 (7 施設から回答)

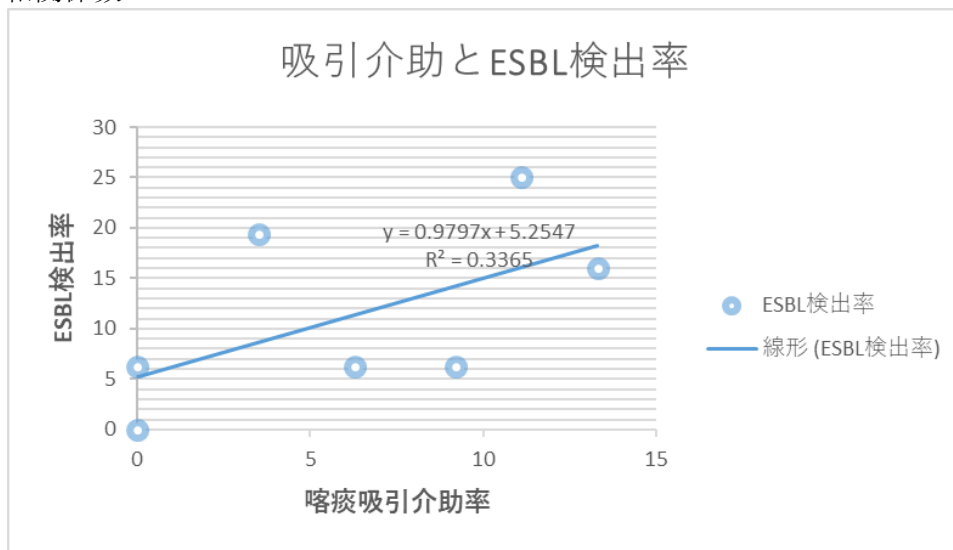


2-1. ケア項目と ESBL 検出率の関係 (単回帰分析)

各ケア項目と ESBL 産生菌の検出率から単回帰分析を行いケアの頻度が ESBL 産生菌の検出に影響を及ぼしているかを確認した。

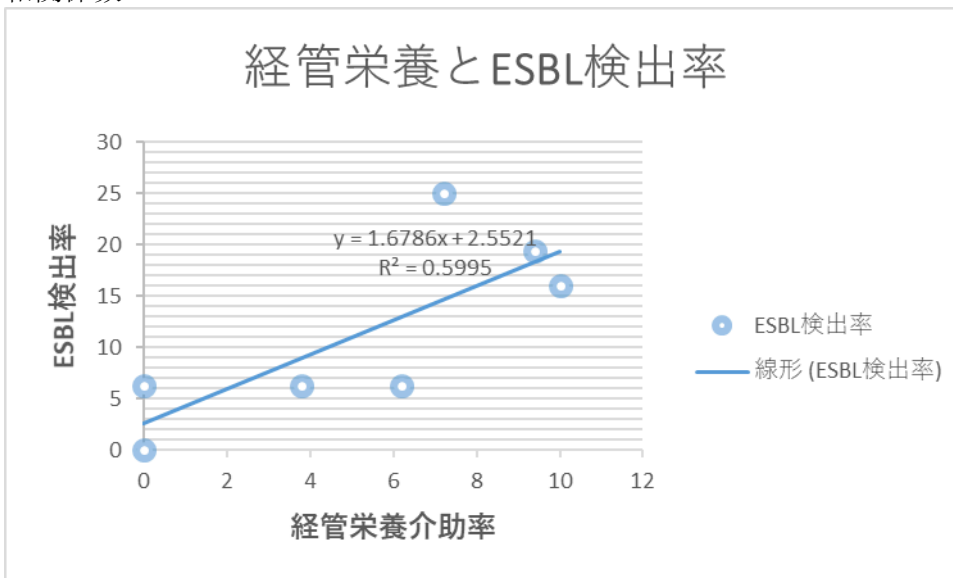
(次ページに続く)

- 1) 喀痰吸引介助
相関係数 0.580



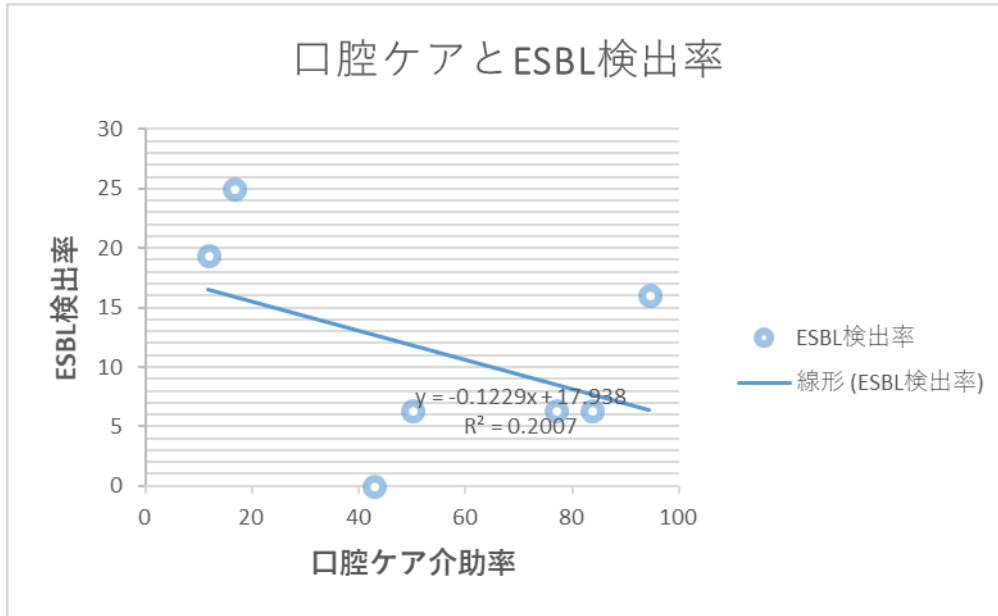
かなり正の相関があると考えられ、喀痰吸引介助が必要な利用者の割合が増加するほど ESBL 産生菌の検出率が高くなると推測された。

- 2) 経管栄養
相関係数 0.774



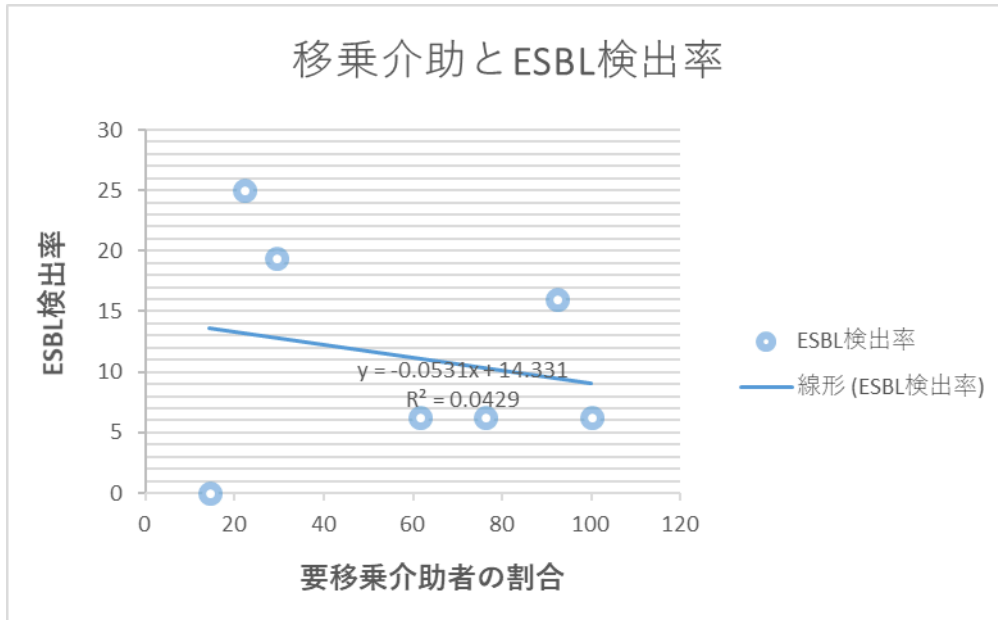
強い正の相関があると考えられ、経管栄養介助が必要な利用者の割合が増加するほど ESBL 産生菌の検出率が高くなると推測された。寄与率も高く信憑性の高いデータであると考えられる。

- 3) 口腔ケア
相関係数-0.448



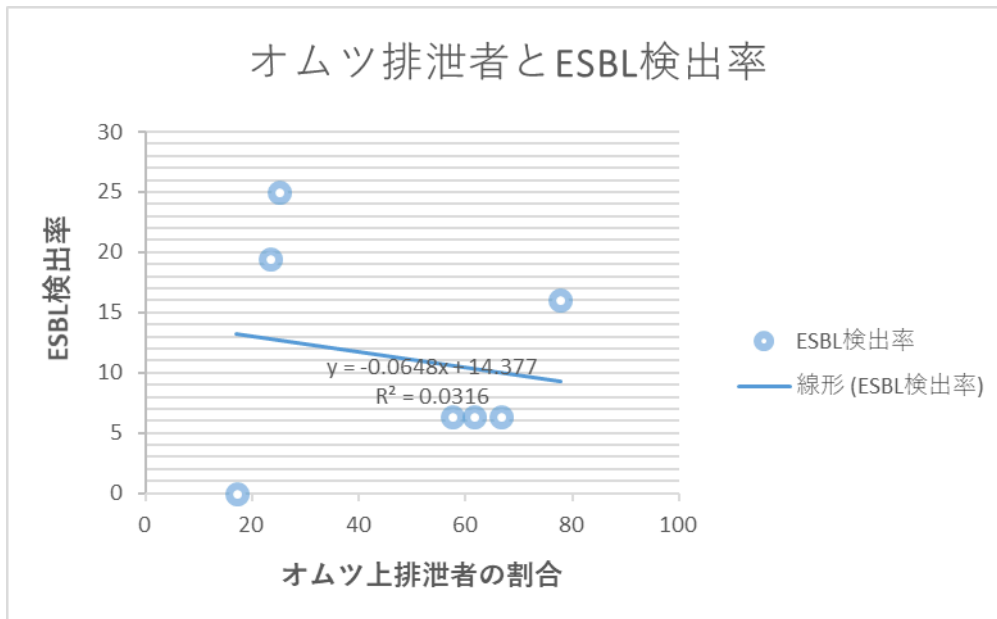
かなり負の相関があると考えられ、口腔ケア介助が必要な利用者の割合が増加するほど ESBL 産生菌の検出率が低くなると推測された。ただし、寄与率が低いことからデータのばらつきが大きいものと考えられた。

- 4) 移乗介助
相関係数-0.207



やや負の相関があると考えられ、移乗介助が必要な利用者の割合が増加するほど ESBL 産生菌の検出率が低くなると推測された。ただし、寄与率は非常に低く今後更なる検討が必要であると考えられる。

5) オムツ上排泄
相関係数-0.178



ほとんど相関はないと考えられる。ただし、寄与率は非常に低く今後更なる検討が必要であると考えられる。

【 まとめ 】

一般的に介護度が高いと耐性菌の保菌率は高くなると考えられており、吸引介助や経管栄養介助を要する利用者の割合と ESBL 産生菌の検出率は一般論から推測されるように正の相関が認められた。しかし、それ以外のケア（口腔ケア、移乗、排泄）では相関が認められない、もしくは負の相関が見られるなどのばらつきが確認された。このような結果となった背景としては、吸引介助や経管栄養介助を要する利用者は嚥下機能障害を伴っているため、誤嚥性肺炎を起こすリスクも高いことから、抗菌薬投与が頻繁に行われているなど、耐性菌伝播／保菌のリスク因子が複合している可能性があることが影響していると考えられた。ただし、本来 ESBL 産生菌は糞便からの検出率が高いため、オムツ上排泄と相関があると推測されたが、オムツ上排泄との相関は見られなかった。この要因として、オムツの使用状況は多岐に渡り、夜間のみオムツを装着する方や主にトイレで排泄しているが、時折失禁してしまう方など、「主にオムツ上排泄」に含むか否かの判断に明確な基準がないためと考えられた。これは口腔ケアや移乗介助にも該当し、介助の有無の基準が不明瞭である介助と明確に区別できる介助で異なる結果となったものと考えられる。

結論として、吸引介助と経管栄養介助を要する利用者の割合が高い施設ほど ESBL 産生菌の検出率は上がると考えられるが、ESBL の検出率の基準値が不明であることから、更なる検討を要すると考えられた。

東海大学 小椋 正道

別添 5

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (平成29年度)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawamura K, Hayashi K, Matsuo N, Kitaoka K, Kimura K, Wachino J, Kondo T, Iinuma Y, Murakami N, Fujimoto S, Arakawa Y.	Prevalence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> B2-O25-ST131 H30R among residents in nonacute care facilities in Japan.	Microb Drug Resist.	In press	In press	2018

IV. 研究成果の刊行物・別刷

AU1 ▶

Prevalence of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* B2-O25-ST131 H30R Among Residents in Nonacute Care Facilities in Japan

AU2 ▶

Kumiko Kawamura,¹ Kengo Hayashi,¹ Nao Matsuo,¹ Kazuki Kitaoka,² Kouji Kimura,² Jun-ichi Wachino,² Takaaki Kondo,¹ Yoshitsugu Ilnuma,³ Nobuo Murakami,⁴ Shuhei Fujimoto,⁵ and Yoshichika Arakawa²

We investigated the prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* among 258 residents of long-term care facilities (LTCFs) in Japan. Out of 258 fecal samples collected from nine LTCFs between November 2015 and March 2017, we recovered 59 ESBL-producing *E. coli* isolates. All isolates carried *bla*_{CTX-M} genes, mainly *bla*_{CTX-M-27} (42.4%), *bla*_{CTX-M-14} (23.7%), and *bla*_{CTX-M-15} (18.6%). The isolates showed 7 serotypes (STs), including ST131 ($n=49$, 83.1%) and ST38 ($n=4$, 6.8%), and 47 (79.7%) out of 49 isolates belonging to ST131 were identified as H30R. The 59 ESBL producers were divided into four groups, B2 (86.4%), D (8.5%), A (3.4%), and C (1.7%); 44 (74.6%) were epidemic clone B2-O25-ST131 H30R, of which 21, 11, and 6 harbored *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-15}, and *bla*_{CTX-M-14}, respectively. Most plasmids were of IncF replicon types ($n=33$), and 22 *bla*_{CTX-M-27}-carrying plasmids showed multiple replicon types, including IncFII, FIA, and FIB. The ESBL producers were susceptible to imipenem, amikacin, and fosfomycin, but resistant to ceftazidime (49.2%), and ciprofloxacin (88.1%); in particular, the isolates harboring the *bla*_{CTX-M-15} gene showed significantly high resistance rate to ceftazidime ($p<0.01$). Our findings indicate that a considerable proportion of the examined LTCF residents carried ESBL-producing *E. coli* isolates in feces and had high prevalence of epidemic clone B2-O25-ST131. Furthermore, continuous investigations would be very necessary to monitor actual carriage states of ESBL-producers among the LTCF residents from the viewpoint of both public health and healthcare viewpoints.

Keywords: extended-spectrum β -lactamase, *Escherichia coli*, B2-O25-ST131 H30R, long-term care facility

Introduction

AU3 ▶

THERE IS A global increase in antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae* species secreting extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), which presents a serious public health threat.¹ Of particular concern is rapid rise of a specific *E. coli* lineage that produces CTX-M-type β -lactamases and belongs to phylogenetic group B2, serotype O25:H4, and sequence type 131 (ST131) and possesses the type 1 fimbrial adhesion (*fimH30*) gene.² ESBL-producing *E. coli* isolates have been recovered not only from various specimens of hospitalized

patients but also from fecal samples of healthy people worldwide.^{3–5} Consistent with these data, in our previous study, we detected intestinal carriage and long-term colonization by CTX-M-type β -lactamase-producing *E. coli* isolates among healthy Japanese people.⁶ However, children, pregnant women, and elderly individuals, who differ not only in terms of lifestyle but also in terms of biological functions such as metabolism, homeostatic function, susceptibility to infections, and pharmacokinetics, also live in the community. Therefore, it is important to monitor the intestinal carriage of ESBL-producing *E. coli*

Departments of ¹Pathophysiological Laboratory Sciences and ²Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi, Japan.

³Department of Infectious Diseases, Kanazawa Medical University, Ishikawa, Japan.

⁴Center for Nutrition Support and Infection Control, Gifu University Hospital, Gifu, Japan.

⁵Department of Bacteriology and Bacterial Infection Division of Host Defence Mechanism, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan.