

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 27-29 年度 総合研究報告書

研究代表者 荒川 宜親

平成30(2018)年 3月

目 次

I. 総合研究報告書

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・・・・・・・・・・1～18

II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・19

III. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・20

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・教授）

研究要旨：本調査研究を開始するに先立って平成 27 年度に研究代表者である荒川宜親は、研究分担者である金沢医科大学の飯沼由嗣教授、名古屋大学医学部保健学科の川村久美子准教授らと相談し、研究の実施に必要な研究計画書等の倫理審査書類を作成し、それを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」に提出して、ヒアリングと文書の修正を行い、平成 27 年 11 月に研究実施に関する承認(承認番号 2015-0304)を得た。これを受け、平成 27 年度の研究協力者である、岐阜大学医学部の村上啓雄教授、東海大学医学部の藤本修平教授らとも連携しつつ、承認された研究計画書に基づいて、それぞれの研究協力施設に赴き、研究内容やその実施に関する説明会を開催した。説明会開催後、各協力施設の研究協力者らにより、各施設において乱数表などを用いて選定した各施設の入所者やその代諾者に対し、研究の目的や方法、不利益などの研究倫理的な内容について説明し、研究に協力することに同意が得られた施設の入所者や在宅患者等より、順次、研究分担者や研究協力者らの協力を得て、咽頭拭い液、糞便、尿などの検体採取を開始した。平成 27 年度中に検体の収集と解析が実施できた愛知県内での予備的調査から、在宅医療患者が MRSA や ESBL 産生菌を一定頻度で保菌していることが確認された。

平成 28 年度は、愛知県、岐阜県、群馬県、石川県および富山県の 9 箇所の高齢者施設（介護施設、療養施設等）の入所者や在宅患者より提供を受けた検体より VRE、MRSA、CRE、ESBL 産生菌、MDRA、MDRP、PR(DSP) の 7 種類の薬剤耐性菌について、統一あるいは同等の感度等のスクリーニング法により耐性株の分離と同定を試み、得られた菌株について順次詳しい遺伝子解析を開始した。その結果、平成 28 年度は、検体提供者数は 200 名を超え、各検体からは、MRSA や ESBL 産生株が一定の頻度で分離された。全検体に占める MRSA と ESBL 産生菌の分離頻度には、施設によりばらつきが見られた。咽頭由来検体が 10 検体以上提供された 8 施設の間では、MRSA の分離頻度は、4.8%から 14.3%、また、糞便検体が 20 検体以上提供された 7 施設の間では、ESBL 産生菌の分離頻度は、9.7%から 52.4%、さらに尿検体が 10 検体以上提供された 7 施設の間では ESBL 産生菌の分離頻度は、6.7%から 27.6%であり、一部の施設での MRSA と ESBL 産生菌の分離頻度は、急性期医療機関での分離率や市中の健常者での保菌率より高い状況が把握された。しかし、幸いにも、国際的に警戒されている、CRE や MDRA、MDRP や VRE は分離されず、また、肺炎球菌については CLSI の定める disk 拡散法で「耐性」と判定される株は検出されなかった。なお、MRSA や ESBL 産生菌の分離頻度の高い施設では、それらの耐性株は生物学的に類似の性状を示すことが多く、施設内拡散が発生している可能性が示唆された。

最終年度の平成 29 年度には、3 年間に 356 名の検体提供者から採取された延べ 802 件の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(CC5)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は、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、その事実は、非急性期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を通じて、遺伝的な性質が同じ MRSA や ESBL 産生大腸菌が共有されていることが示唆された。

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

研究協力者（敬称略、順不同）

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
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等氏名

（敬称略、順不同）
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
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

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）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、介護施設等の入所者における、薬剤耐性菌の保菌状況や分離株の生物学的特性、遺伝的特性などの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に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. 研究を進める上での分担と連携

研究代表者である荒川宜親と研究者分担者である川村久美子准教授のグループでは、3年間を通じて、愛知県内の施設を担当し、県内の3施設において説明会を実施し、それぞれの施設における検体採取に協力し、各施設から提供された検体より7種類の耐性菌の分離を試みた。それとともに、研究分担者である岐阜大学の村上啓雄教授により岐阜県内の施設で採取された検体、および東海大学の藤本修平教授により群馬県の施設で採取された検体を受け入れ、各種の耐性菌の分離を試みた。岐阜県内の施設における検体採取については、研究分担者である村上啓雄教授が自ら各施設に赴き、説明会の開催とインフォームド・コンセントの取得、検体採取等を実施しつつ、またその指導のもとに施設職員の協力により検体採取が実施された。群馬県内の施設における検体採取については、研究分担者である藤本修平教授が自ら施設に赴き、説明会の開催とインフォームド・コンセントの取得、検体採取等を実施しつつ、またその指導のもとに施設職員の協力により検体採取が実施された。一方、金沢医科大学の飯沼由嗣教授のグループにより石川県や富山県内の施設においても同様な手続きを経て検体が採取され、検体からの耐性菌の分離は金沢大学で実施された。金沢医科大学のグループにより分離された耐性菌株については、金沢医科大学において菌種の同定や薬剤感受性試験、PCR解析など一部の細菌学的解析等が実施された後、詳しい遺伝子解析等を実施するため、分離株は名古屋大学に送付され、研究代表者の荒川宜親のグループおよび研究分担者の川村久美子准教授のグループの連携により、耐性株のPOT解析とMLST解析、個々の薬剤耐性遺伝子のPCR検出とDNAシーケンス解析による遺伝子型別、プラスミドレプリコン型別、さらに一部の株については、ゲノム解析などが実施された。

また、東海大学の藤本教授により、療養型施設や介護施設などの入所者および在宅患者などに入所している意思疎通が円滑にできない被験者から、非侵襲的あるいは非侵襲的な手法で、糞便、直腸スワブ、喀痰、咽頭拭い液、鼻汁、尿などを採取し、薬剤耐性菌などを分離して実施する研究であって、検体提供者の個人情報や診療情報などを扱わない基礎的な研究を実施する際に必要な研究倫理的な手続き等について平成29年度に検討が試みられた。

2. 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薬剤耐性菌の分離状況などを明らかにすることを目的としている。そのため、在宅患者や療養施設等入所者から、咽頭拭い液、便、尿などの検体の提供を受ける必要があり、平成27年度に研究開始に先立って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」での審査と承認を得る手続きを行った。

3. 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

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)、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

4. 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℃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、耐性菌の分離を担当した名古屋大学と金沢医科大学のグループとで原則的に同等の方法を採用した。

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℃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disk拡散法で判定した。尿、糞便および褥創滲出液については、MRSA、VRE、ESBL産生菌、CRE、MDRP、MDRAの各選択培地に検体を接種し、一夜37℃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産生菌、CREを対象とした増菌培養を行った。

5. 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、薬剤感受性試験、PCRおよびPCR産物の塩基配列のシーケンス解析により耐性遺伝子の検出と確認、型別を実施した。

倫理面への配慮

本研究は、低侵襲的あるい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った後、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、順次、便、喀痰(咽頭スワブ)および尿等の提供を受けたが、検体からの分離株の解析にあたっては、菌株の細菌学的な解析のみであり、入所者の個人情報や在宅医療患者の診療情報等は一切用いなかった。

C. 研究結果

1. 全体的な傾向

平成27年度から平成29年度の3年間に、愛知、岐阜、石川、富山および群馬の5県の9施設の入所者356名から採取された延べ802件の検体より分離された、耐性菌の中ではMRSAとESBLの分離率が高かったが、CREやVRE、MDPP、MDRAは分離されず、またCLSIの推奨するdisk拡散法でPRSPと判定される株も分離されなかった。

MRSAやESBL産生大腸菌の分離率については、施設ごとにかかなりのばらつきが見られ、分離件数の多い施設では、菌株の遺伝子型などから判断した場合、施設内伝播の発生が示唆された。

2. 耐性株の分離株数と分離頻度

表A～Dに、各施設からの検体提供数やそれぞれの検体から分離されたMRSAおよびESBL産生菌の株数と分離頻度を示す。

咽頭由来検体が10検体以上提供された8施設の間では、MRSAの分離頻度は、4.8%から14.3%、また、糞便検体が20検体以上提供された7施設の間では、ESBL産生菌の分離頻度は、9.7%から52.4%、さらに尿検体が10検体以上提供された7施設の間ではESBL産生菌の分離頻度は、6.7%から27.6%であり、施設間でかなりのばらつきが見られた。

3. 分離株の遺伝子型

表1～7と図1～3に示すように、MRSAとESBL産生大腸菌分離株の遺伝子解析の結果、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)の双方が同程度の割合で分離される傾向が見られた。特にHA-MRSA(ST5)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であるST764(CC5)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は、腸内細菌科細菌の間で接合伝達しやすいIncFグループに属し、さらに、媒介されている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。

D. 考察

今回の研究により、介護施設や療養型施設の入所者、在宅医療患者等からも急性期医療機関で問題となっているMRSAやESBL産生菌が一定の頻度で分離され、一部の施設では、急性期医療機関での分離頻度より高い頻度で分離されていることが確認された。介護施設や療養型施設では、一般的に抗菌薬の選択圧が急性期医療機関のそれと比べ低いとされているため、高い頻度で分離される背景として、以下が推定される。

a. 介護施設や療養型施設では、急性期医療機関に於いて実施されている確実な伝播防止策(標準予防策や接触予防策など)が実行し難く、特に排便の処理や口腔ケアなどの際に、汚染が広がりやすい可能性がある。

b. 今回、介護施設や療養型施設等から分離されたMRSAやESBL産生株は、いわゆる「国際流行株」と呼ばれる遺伝型に属する株が多く、抗菌薬の選択圧が低い環境でも、ヒトの体表面や口腔、気道、腸管などに定着しやすく、入所者で長く保菌され、また入所者間で伝播拡散しやすい性質を獲得した株が広がっている可能性が強く示唆された。

さらに、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産生大腸菌が広がっている施設が存在が確認されたが、これには療養型施設や介護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を介して、遺伝的な性状が類似した施設内で定着、拡散しやすいタイプのMRSAやESBL産生大腸菌が共有されている可能性が示唆された。

例えば、MRSAについては、HA-MRSAに属するMRSA ST764(CC5) (SCCmec type II)が、地理的に異なる複数の施設で分離された。ST764は代表的なHA-MRSAであるST5に遺伝的に近く、さらに、SCCmec 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においても伝播拡散する能力が高い可能性もあり、今後、注意と監視が必要なST型の一つと考えられる。

療養型施設や介護施設等における耐性菌対策については、一定レベル以上の細菌感染防御能力が維持されている入所者の多い施設では、施設の清掃等の一般的な衛生管理措置の適切な実施が求められるが、細菌感染防御能力が低下した低栄養の入所者や誤嚥などを起こしやすい入所者などの多い施設では、急性期医療機関で実施されているような、より確実な伝播防止策（接触予防策等）の実施が重要になってくる場合もあると考えられ、施設入所者の健康状態や感染症に対する防御能力などの状況を考慮した、施設に応じた効果的かつ実施可能な薬剤耐性菌の伝播防止策の作成と実行が必要と考えられる。

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9の施設の入所者等から分離されたMRSAやESBL産生菌については、施設間でその分離頻度にかかなりのばらつきが見られ、一部では、急性期医療機関における分離頻度を超える施設もみられた。

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、国際的に広く流行しているクローン(*E. coli* ST131-B2)が多く分離され、また、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産生大腸菌が高頻度で分離される施設では、遺伝的に類似した耐性株が複数の異なる入所者から分離される傾向が見られ、当該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MRSAやESBL産生大腸菌の分離頻度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「国際流行型」の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可能性が、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)や国際流行クローンである*E. coli* ST131-B2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、療養型施設等でのさらなる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, Inuma 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 |
| 3. その他 | なし |

表 A 検体別耐性菌総分離数

7種類の薬剤耐性菌の検出状況

薬剤耐性菌	咽頭拭い液 n=278	鼻腔粘液 n=30	尿 n=234	便 n=258	その他 n=2	Total n=802
ESBL	2 (0.7)	0	29 (12.4)	65 (25.6)	0	96 (11.97)
MRSA	23 (8.3)	2 (6.7)	4 (1.7)	10 (3.9)	0	39 (4.86)
MDRP	0	0	0	0	0	0
MDRA	0	0	0	0	0	0
VRE	0	0	0	0	0	0
PR(I)SP	0	0	0	0	0	0
CRE	0	0	0	0	0	0

表B 施設別の検体採取数

	F	G	E	A	C1	C2	C3	K	Y	合計
咽頭	42	26	14	30	21	11	65	68	1	278
尿	37	21	5	29	8	10	25	69	30	234
糞便	31	20	1	36	21	11	38	72	28	258
鼻腔	0	0	0	30	0	0	0	0	0	30
その他	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
total	110	67	20	125	52	32	128	209	59	802

表C MRSAの施設別検体別分離株数と分離頻度()内

	F	G	E	A	C1	C2	C3	K	Y	
咽頭 (278検体)	5 (11.9)	2 (7.6)	2 (14.3)	2 (6.7)	1 (4.8)	-	5 (7.7)	5 (7.4)	1 (100)	23
鼻腔 (30検体)	-	-	-	2 (6.7)	-	-	-	-	-	2
尿 (234検体)	3 (0.8)	0	0	0	0	0	0	1 (1.4)	0	4
糞便 (258検体)	0	0	0	2 (5.6)	0	1 (9.1)	1 (2.6)	6 (8.3)	0	10
全検体 (802検体)	7 (6.4)	2 (3.0)	2 (10.0)	6 (4.8)	1 (1.9)	1 (3.1)	6 (4.7)	12 (5.7)	1 (1.7)	38

表D ESBL産生菌の施設別検体別分離株数と分離頻度()内

	F	G	E	A	C1	C2	C3	K	Y	
咽頭 (278検体)	0	1 (3.8)	0	1 (3.3)	0	0	0	0	0	2
鼻腔 (30検体)	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0
尿 (234検体)	4 (10.8)	4 (19.0)	0	8 (27.6)	2 (25.0)	0	0	9 (12.9)	2 (6.7)	29
糞便 (258検体)	3 (9.7)	8 (40.0)	0	11 (30.6)	11 (52.4)	2 (18.2)	8 (21.1)	18 (25.0)	4 (14.3)	65
全検体 (802検体)	7 (6.3)	13 (19.4)	0	20 (16.0)	13 (25.0)	2 (6.3)	8 (6.3)	27 (12.8)	6 (10.2)	161

-: 検体が無く、検査を実施せず。

灰色: 検体が一定数以上なかったため、参考値

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 $\mu\text{g/mL}$

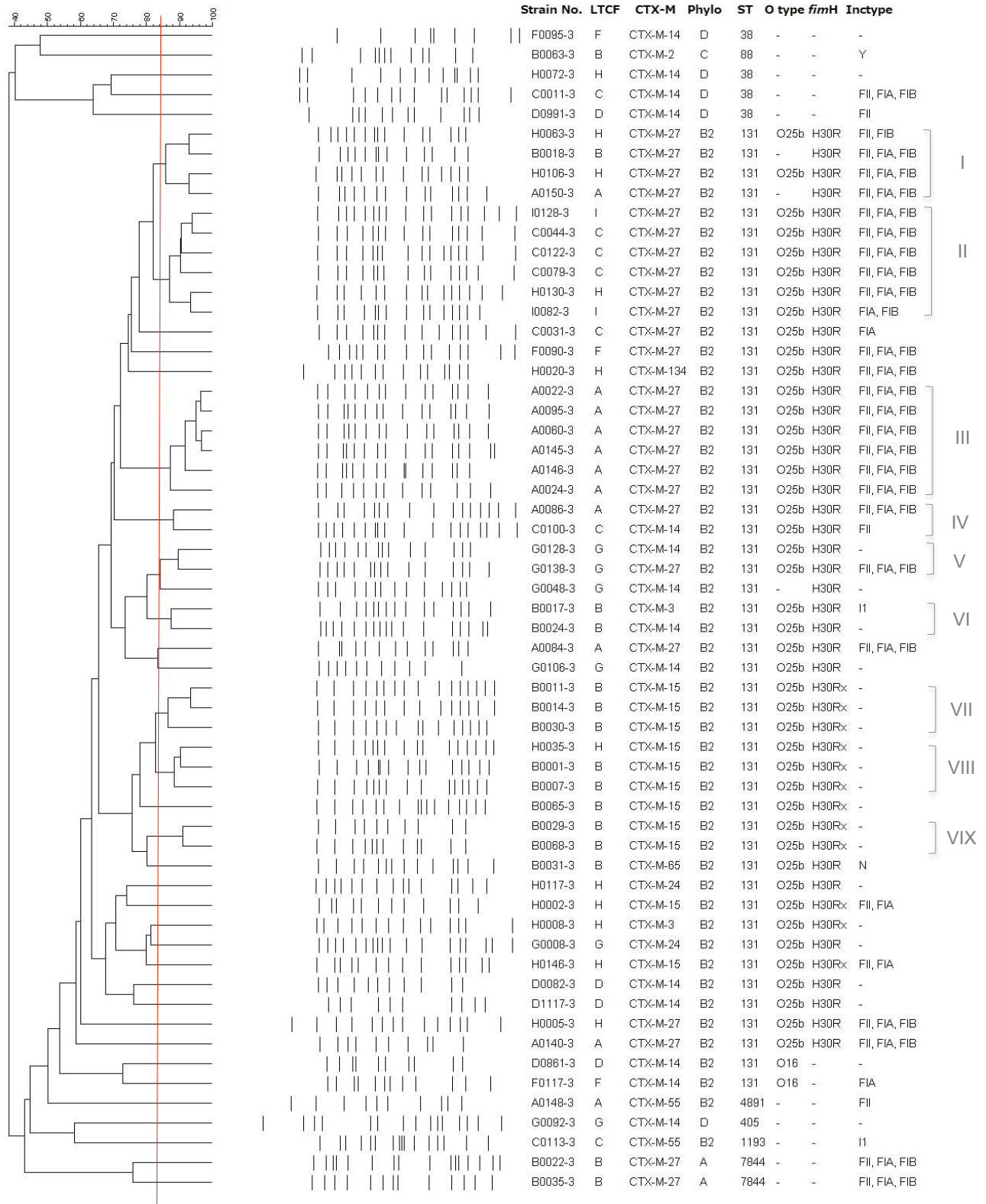


図1. 糞便由来ESBL産生大腸菌59株のPFGE解析

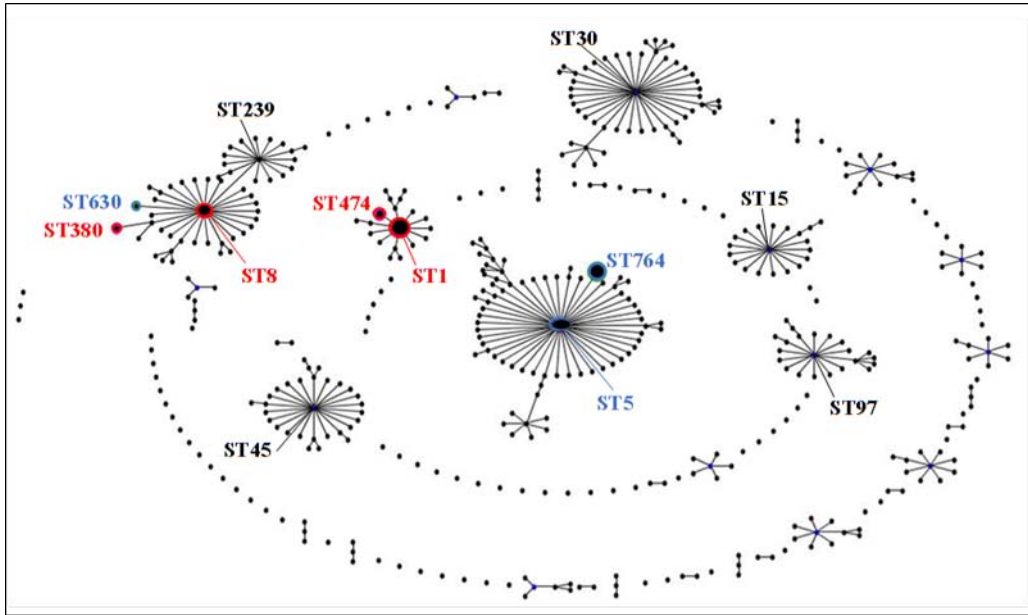


图2. MRSAのeBURST解析

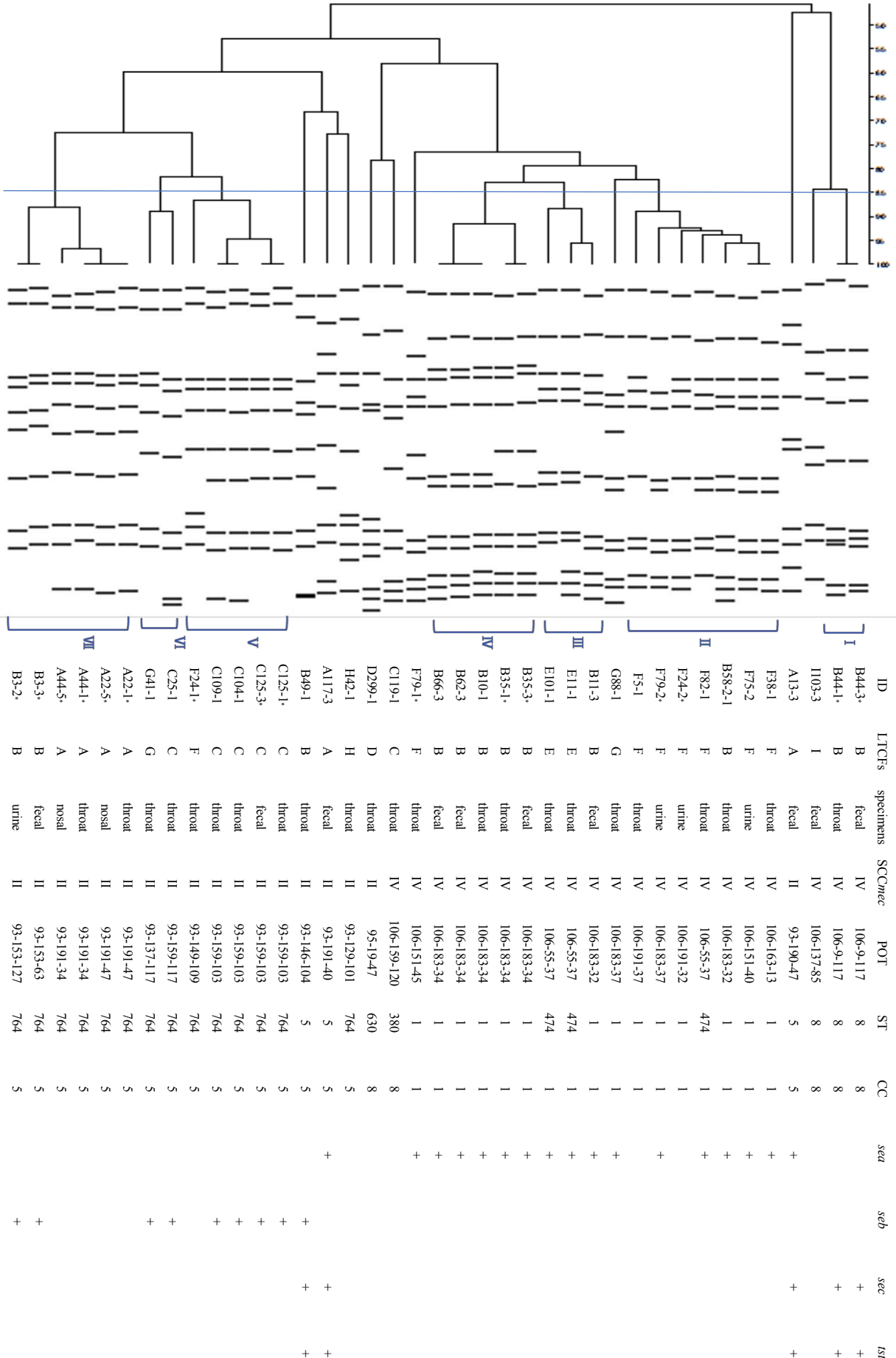


図3. MRSA 39株のPFGE解析

別添 5

II 研究成果の刊行に関する一覧表 (平成27-29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

III. 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.