

令和元年6月5日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09194

研究課題名(和文) 広島県下医療施設の抗菌薬使用数量と耐性菌分離率並びに分離株の性状に関する調査研究

研究課題名(英文) Molecular epidemiological analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated in the hospitals in Kure District, Hiroshima

研究代表者

佐和 章弘 (Sawa, Akihiro)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：70389104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：医療施設内で抗菌薬使用の適正化を図り、耐性菌の出現・拡大を防止することは、感染症制御にとって極めて重要な課題である。報告者は、広島県下医療機関における薬剤耐性菌の拡大や選択圧を制御できる抗菌薬管理プログラムの提案を目指して、2017年に呉地区の医療施設で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)102株の分子疫学的解析を実施した。その結果、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)により16の型に分類された。その内、A-Cに型別される菌は全体の46%を占め、今回分離された菌の主要な型であった。異なる施設間で同系統の菌が検出されたことから、今後も同地域での監視を継続する必要があると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2017年に呉地区の医療施設で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)102株の分子疫学的解析を実施した。その結果、呉地区の異なる医療施設間で同系統のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が検出され、同一地域に共通の菌株の分布が推察された。現在の呉地区の高齢化率は、全国の高齢化率に対して高い値となっている。現在の呉地区の高齢化率は2040年での全国の推計高齢化率とほぼ同じ値と言われており、これからの高齢者に対する感染症対策において、地域事情に則した抗菌薬適正使用の推進と将来的な耐性菌の対策の分野に波及効果をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is known as a common pathogen of nosocomial infections. The widespread emergence of MRSA is becoming a serious concern in global public health. In this study, we performed molecular epidemiological analysis of 102 strains isolated in the hospitals in Kure District, Hiroshima in 2017. The analysis using pulse-field gel electrophoresis (PFGE) revealed that those strains were classified into 16 types. Among these PFGE types, types A to C accounted for almost half (46%). It was also found that Type A strain possesses SCCmec Type 4 and ST1, and Type B and C strains possess SCCmec Type 2 and ST764. We therefore consider that MRSA strains having these genotypes may be predominant strains isolated from the hospitals in Kure area. Further studies will provide valuable information to control MRSA infection in Kure area.

研究分野：医療薬学、病院・医療管理学

キーワード：薬剤耐性 院内感染管理

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

入院患者の半数以上は抗菌薬による治療を受けているが (Pestotnik S. L. et al., *Ann. Intern. Med.*, 1996)、本剤の使用に伴って耐性菌の発現、そして耐性菌を起炎菌とする院内感染の増加が現在社会的な問題となっている。また、2007年4月に改正された医療法では、医療機関は院内感染の発生動向を調査した上で、発生原因の解明と現に起こっている感染症を蔓延させないための活動を組織的に実施することが義務化されている (徳本史郎, *INFECTION CONTROL*, 2008)。そのため、医療施設内で抗菌薬使用の適正化を図り、耐性菌の出現・拡大を防止することは、感染症制御にとって極めて重要な課題である。

実際に厚生労働省発の平成22年度診療報酬改定資料によれば、「医療機関は微生物検査を適宜利用して抗菌薬の適正使用を推進すること、また、抗MRSA薬や広域スペクトルを示す抗菌薬の使用に際して届出制とするほか、投与量・投与期間を的確に把握し、臨床上問題と判断した場合には投与方法のさらなる適正化を実施する」と記されている。これらの指針は、単にその要件を満たすべく速やかな対応を図るだけでは不十分であり、適正使用の結果が各種耐性菌の制御に真に直結しなければならないことを示している。さらに、近年において抗菌薬の適正使用は医療機関が個別に考える問題ではなく、抗菌薬の使用数量などの情報を同一医療圏に属する施設同士が互いに共有化し、地域全体が一体化して耐性菌を制御できる仕組みを作る必要性が叫ばれている (小笠原康夫ら, *環境感染誌*, 2011)。すなわち、実効性・継続性・地域性を併せ持つ抗菌薬管理プログラムを構築して臨床上問題となる耐性菌の選択圧を低下させ、院内感染対策の充実・推進が可能となる環境を医療現場は必要としている。しかしながら、臨床で使用される抗菌薬は多種多様である上に、どの抗菌薬をどの程度使用すると耐性菌の出現や拡大のリスクが高まるのか、また、耐性菌の地域内における拡散などについての情報は本邦において過去に殆んど報告がなく、抗菌薬管理プログラムの一環として上記した抗菌薬使用の届出制を地域医療圏で敢行しようとしても、その根拠となる使用数量などに関するデータは乏しいのが現状である。加えて、地域医療圏内の各医療施設で分離された各種耐性菌が同一菌株由来のものであるのかなど、細菌学的な見地に立った基礎データの集積も決して十分とは言えない状況である。院内感染対策をさらに進めて医療安全の質を高く確保するためには、耐性菌分離率の低下と院内や地域への耐性菌蔓延の阻止を可能とする抗菌薬使用数量や治療日数などのカットオフ値を設定するなど、新たな視点での抗菌薬管理プログラムの構築が不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者は学内基礎系教員と研究チームを組織し、広島県下の複数の急性期型病院との連携の下、次の目標を達成すべく研究を計画した。先ず、分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対し、申請者らの研究室を拠点として分離菌が保有する遺伝子の分子疫学的な解析を進める。具体的には、パルスフィールド電気泳動法、SCC*mec* 遺伝子、multilocus sequence typing (MLST)、コアグラマーゼ遺伝子による遺伝子型別分類を実施する。さらに、病原因子である Panton-Valentine leucocidin (PVL) 遺伝子の保有状況の決定を行う。これらの活動により得られるデータは、分離された菌株が対象とした地域医療圏内において、どこを起源に、どのように広がっていったかを推察する貴重なデータになるものと考えている。さらに、これらの情報に加えて、抗菌薬使用数量についての調査結果を加えることで広島県下医療機関における薬剤耐性菌の拡大や選択圧を制御できる抗菌薬管理プログラムの基盤となる情報を提案するものと考えている。

3. 研究の方法

本研究は、単離された分離株について上記の遺伝子タイピングの解析を進め、薬剤耐性菌の由来や拡大傾向を把握し、抗菌薬の使用数量に関する情報と総合することで地域医療圏における抗菌薬管理プログラムの基盤構築を目的としている。

医療施設より分離された MRSA102 菌株について以下の遺伝子型別分類を実施した。

(1) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法

一夜培養した菌液 300 μ L の TE buffer に懸濁後、4 μ L の lysostaphin (1 mg/ml) を加えてピペティングにより緩やかに混合する。60°C に保温した 1.5% Low Melting Point agarose を 300 μ L 加え混合後、インサートモールドに流し込む。ゲルを 3 mL の lysis buffer (6 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% Brij58, 0.2% Sodium deoxycholate, 0.5% Sodium lauroylsarcosine) を加え 37°C の水浴で 4 時間ゆっくり振盪する。遺伝子の切断は 20U の *Sma*I を含む溶液中で 30°C、3 時間処理することにより行った。電気泳動は Bio-Rad CHEF-DRII system (Volts = 200 (6v/cm), Temp = 14°C, Initial switch = 5 seconds, Final switch = 40 seconds, Run time = 20 hours) で行った。得られたバンドパターンを系統樹解析ソフト BioNumerics で分子系統樹を作成した。

(2) *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*) typing

一夜培養した菌液にシカジーニアス DNA 抽出試薬 (関東化学) を加え DNA を PCR の鋳型として使用した。ccr 遺伝子複合体ならびに mec 遺伝子複合体を増幅するプライマーを用いて PCR を行い、得られる増幅断片の長さにより遺伝子型を決定した。

(3) Multilocus sequence typing (MLST)

上記で調整した溶液を PCR 鋳型 DNA として、arcC (Carbamate kinase), aroE (Shikimate dehydrogenase), glpF (Glycerol kinase), gmk (Guanylate kinase), pta (Phosphate acetyltransferase), tpi (Triosephosphate isomerase), yqi (Acetyl coenzyme A acetyltransferase) それぞれの遺伝子

配列を決定した。得られた配列をデータベース (<http://www.mlst.net/>) で照合し sequence type (ST) を決定した。

(4) コアグラウゼ遺伝子 (*coa*) 型の決定

コアグラウゼ遺伝子を増幅するプライマーを用いて、得られる増幅断片の長さにより遺伝子型を決定した。

(5) Panton-Valentine leucocidin (*pvl*) 遺伝子保有状況の調査

PVL 遺伝子を増幅するプライマーを用いて、増幅断片の有無により遺伝子の保有状況を決定した。

4. 研究成果

2017年1月～12月に呉市内の2病院より分離されたMRSA 102株を実験に使用した(表1)。分離されたMRSAをPFGEにより得られたバンドをもとに遺伝子型を決定した(図1)。その結果、16のPFGE型に分類された(表2)。その内、A-Cに型別される菌は全体の46%を占め、今回分離された菌の主要な型であることが明らかになった。A型はSCCmec Type 4、ST1と決定されUSA400と同系統のクローンであることが推察される。B型はSCCmec Type 2、ST764と決定された。C型はSCCmec Type 2、ST764であり、B型と同系統の菌であることが推察される。102株中HA-MRSAは34株(33%)、CA-MRSAは29株(28%)であることがわかった。*Pvl*を保有する菌株は全ての分離株から検出されなかった。*Coa*遺伝子型は2,3,4,5型が多く検出された。一方で、1,7,8型は少数で6型は検出されなかった。

異なる施設間で同系統のPFGE型の菌が検出されたことから、これらの系統は呉地域で広く分布している可能性が推察される。これらの結果から引き続き監視を続ける必要がある

表1 MRSAの検体の種類と分離状況

検体の種類	病院ごとのMRSAの分離状況		Total
	KI (%)	SK (%)	
喀痰	28 (36)	16 (64)	44
創傷部	12 (16)	1 (4)	13
血液	3 (4)	1 (4)	4
糞便	5 (6)	2 (8)	7
尿	5 (6)	4 (16)	9
皮膚	8 (10)	0 (0)	8
鼻腔	7 (9)	0 (0)	7
その他	9 (11)	1 (4)	10
	77 (100)	25 (100)	102

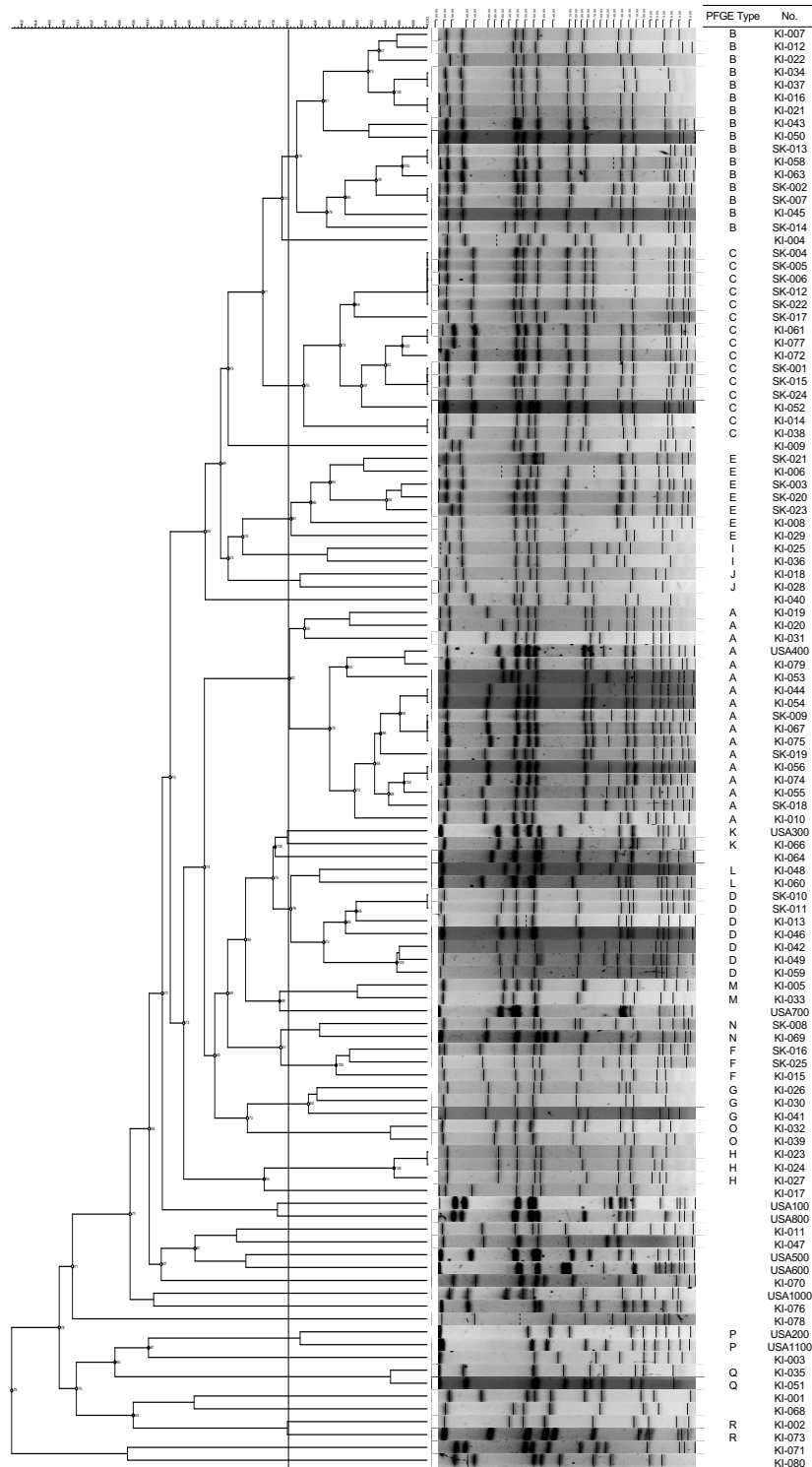


図1 PFGE解析による分離菌株系統樹

と考える。

表2 PFGE型に基づく分離状況と各種遺伝子型

PFGE Type	病院ごとのMRSAの分離状況		Total (%)	SCCmec Type	ST	pvl	coa Type
	KI (%)	SK (%)					
A	13(17)	3(12)	16	4	1	-	7, 8, 5
B	12(16)	4(16)	16	2	764	-	1, 2, 3, 4, 5, 7
C	6(8)	9(36)	15	2	764	-	2, 5
D	5(8)	2(8)	7	4	8	-	3
E	3(4)	4(16)	7	2	5	-	2, 5
F	1(1)	2(8)	3	4		-	3
G	3(4)	0(0)	3	4	8	-	3
H	3(4)	0(0)	3	4	380	-	3, 8
I	2(3)	0(0)	2	2		-	5
J	2(3)	0(0)	2	2		-	5
K	1(1)	0(0)	1	4	8	-	
L	2(3)	0(0)	2	4		-	
M	2(3)	0(0)	2	4	30	-	4, 7
N	1(1)	1(4)	2	4	8	-	3
O	2(3)	0(0)	2	2		-	5
Q	2(3)	0(0)	2	4		-	3
その他	17	0	17			-	
	77 (100)	25 (100)	102				

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計21件)

藤田烈、高野八百子、渡邊都貴子、坂木晴世、黒須一見、柴谷涼子、縣智香子、四宮聡、坂本史衣、清水潤三、佐和章弘 他 JHAIS 委員会・医療器具関連感染サーベイランス事業概要および集計結果の報告、日本環境感染学会誌(Web)、2018、Vol.33、No.5、頁 256-266、DOI:10.4058/jsei.33.256

佐和章弘、森兼啓太、針原康、清水潤三、JHAIS 委員会・SSI サーベイランスの全国集計結果(No.19)の報告、日本環境感染学会誌(Web)、2018、Vol.33、No.5、頁 246-255、DOI:10.4058/jsei.33.246

河野雄一、岡野太一、小野光重、伊藤博之、佐和章弘
当院における Clostridium difficile 感染症の下痢症状持続期間に影響を与える各種要因の検討、日本環境感染学会総会・学術集会(Web)、2018、Vol.33、頁 11-18、

佐和章弘、JHAIS-SSI サーベイランスデータの集計および解析結果、日本外科感染症学会雑誌、2018、Vol.15、No.5、頁 477、

佐和章弘、JHAIS SSI サーベイランス最新の全国集計結果、日本手術医学会誌、2018、Vol.39、頁 55、

池本雅章、荒川隆之、伊藤孝史、今津智子、内海敦史、岡田麻衣子、岡野太一、岡本直樹、川上恵子、川根良太、栗原晋太郎、先森満子、菅原隆文、角井碧、田中和行、長藤多香美、西田朋洋、日浦昌洋、廣澤匡、武郷徹、細川宜嗣、前田龍人、牧賢利、光廣貴紀、向田俊司、安原昌子、山口伸二、山田啓太、山田富美子、余越芳子、吉岡友美、秋本伸、泉谷悟、鶴池敏令、桑原秀徳、佐和章弘 他、広島県下31施設における抗菌薬使用密度と耐性菌分離率に関する地域共同サーベイランス、広島県病院薬剤師会誌、2018、Vol.53、No.1、頁 5-22、

佐和章弘、森兼啓太、針原康、清水潤三、JHAIS 委員会・SSI サーベイランスの全国集計結果(No.18)の報告、日本環境感染学会誌、2017、Vol.32、No.5、頁 291-301、DOI:10.4058/jsei.32.291、

佐和章弘、JHAIS-SSI サーベイランス 最新の全国集計結果、2017、Vol.38、頁 104、

河野雄一、伊藤博之、小野光重、岡野太一、佐和章弘、当院における Clostridium difficile 感染症の検査結果と患者背景の関連性について、

日本環境感染学会誌 2017、Vol.32、頁 4-5、

山口伸二、荒川隆之、池本雅章、伊藤孝史、岡田麻衣子、岡野太一、岡本直樹、川上恵子、川根良太、北正智美、久保有子、栗原晋太郎、先森満子、菅原隆文、角井碧、田中和行、長藤多香美、西田朋洋、日浦昌洋、廣澤匡、武郷徹、細川宜嗣、堀田修次、前田龍人、光廣貴紀、向田俊司、安原昌子、山田啓太、山田富美子、余越芳子、吉岡友美、米津亜希子、佐和章弘 他、広島県下 31 施設における抗菌薬使用密度と耐性菌分離率に関する地域共同サーベイランス、広島県病院薬剤師会誌、2017、Vol.52、No.1、頁 3-15、

尾川雄一、大和浩之、三田将史、横山敬子、細川暁則、松浦征也、中野昇、前田志津子、佐和章弘、三宅勝志、患者の保険薬局の選択に影響を与える重要因子の抽出-患者向けアンケートの分析結果に基づくかかりつけ薬局へのアプローチ-、薬局薬学、2017、Vol.9、No.1、頁 96-105、

赤平恵美、一条和枝、小山田厚子、勝平真司、桐則行、齋藤潤栄、白野倫徳、鈴木義紀、高田英之、高橋尚子、根岸美恵、藤永聡、松田純一、井上隆俊、中瀬晶二、三木晴久、佐和章弘、森兼啓太、感染管理システム施設連携研究会 12 施設による抗菌薬使用と耐性菌分離率に関する国内共同サーベイランス、日本環境感染学会誌、2017、Vol.32、頁 10-11、

常友盛勝、鶴池敏令、岡本直樹、光廣貴紀、豊見敦、泉谷悟、柴田ゆうか、中本匡美、安原昌宏、秋本伸、桑原秀徳、中村亜由美、池本雅章、佐和章弘、福原伸治、武郷徹、安原昌子、川上恵子、松本俊治、新井茂昭、佐藤英治、荒川隆之、佐々木雄啓、谷口雅敏、日浦和徳、中村徹志、木平健治、広島県における地域連携ネットワークに関するアンケート調査、広島県病院薬剤師会誌、2017、Vol.52、No.4、頁 213-219、

佐和章弘、JHAIS SSI サーベイランスの集計データとその解析、日本外科感染症学会雑誌、2017、Vol.14、No.5、頁 450、

山口伸二、荒川隆之、池本雅章、岡田麻衣子、岡野太一、川上恵子、川根良太、栗原晋太郎、長藤多香美、細川宜嗣、前田龍人、向田俊司、安原昌子、山田啓太、吉岡友美、佐和章弘、広島県下 31 施設による抗菌薬使用と耐性菌分離率に関する地域共同サーベイランス、日本環境感染学会誌、2017、Vol.32、頁 24-29

佐和章弘、森兼啓太、針原康、清水潤三、JHAIS SSI サーベイランスの全国集計結果(No.17)の報告、日本環境感染学会誌、2016、Vol.31、No.5、頁 335-343、DOI:10.4058/jsei.31.335

佐和章弘、「実施するだけ」からの脱却 サーベイランス活用のレベルアップ 国内サーベイランスの最新動向とその活用・応用 1)大規模サーベイランス-JHAIS・JANIS、感染対策 ICT ジャーナル、2016、Vol.11、No.3、頁 217-223、

佐々木雄啓、町田加純、池本雅章、上田充展、川島英史、中村寛、佐和章弘、ドパミン D2 受容体遮断薬服用患者における誤嚥性肺炎に影響を与えるリスク因子の検討、日本病院薬剤師会雑誌、2016、Vol.52、No.8、頁 1008-1012、

鶴池敏令、泉谷悟、岡本直樹、笠原庸子、柴田ゆうか、常友盛勝、松本俊治、光廣貴紀、池本雅章、川上恵子、佐和章弘、豊見敦、長島悟史、中本匡美、長谷部敦子、福原伸治、武郷徹、安原昌子、安原昌宏、新井茂昭、荒川隆之、佐々木雄啓、谷口雅敏、日浦和徳、中村徹志、木平健治、外来における薬剤説明・指導業務に関するアンケート調査、広島県病院薬剤師会誌、2016、Vol.51、No.2、頁 73-84

小野光重、伊藤博之、岡野太一、河野雄一、佐和章弘、蛍光法による当院看護師の手指衛生の手技評価と手技の良否に影響を与える要因の検討、日本環境感染学会誌、2016、Vol.31、頁 283、

河野雄一、小野光恵、岡野太一、伊藤博之、奥田立子、佐和章弘、当院における ESBL 産生菌の検出状況と患者背景、日本環境感染学会誌、2016、Vol.31、頁 469、

〔学会発表〕(計 7 件)

前田 龍人、小林 秀丈、吉崎 瑞徳、佐和 章弘、岡野 太一、木村 幸司、清家 総史、山中 浩泰、呉地区の医療施設で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分子疫学解析、日本薬学会年会、2019、

河野雄一、岡野太一、小野光重、伊藤博之、佐和章弘、当院における Clostridium difficile 感染

症の下痢症状持続期間に影響を与える各種要因の検討、日本環境感染学会総会・学術集会、2018

上田充展、佐々木雄啓、佐和章弘、三宅勝志、D2 受容体遮断薬服用患者における誤嚥性肺炎の発生状況と発生に影響を与えるリスク因子の検討、医療薬学フォーラム講演要旨集、2018、

前田志津子、手嶋茂貴、田山剛崇、安原昌子、寺重隆視、杉原数美、佐和章弘、三宅勝志、タ
ンニン酸アルブミンの製品間比較-帯電量調査-、日本薬学会年会、2016

尾川雄一、大和浩之、三田将史、横山敬子、細川暁則、松浦征也、中野昇、前田志津子、佐和
章弘、三宅勝志、患者の保険薬局の選択に影響を与える重要因子の抽出-患者アンケートの分析
結果に基づく「かかりつけ薬局」へのアプローチ-、日本薬剤師会学術大会、2016

安原昌子、田山剛崇、佐和章弘、三宅勝志、当院におけるシタグリプチン服用患者の HbA1c
の推移と治療成績に影響を与える要因の検討、日本薬学会年会、2016

中山愛咲、安原昌子、神原美子、長坂頼子、佐々木雄啓、胡田順子、田山剛崇、木村幸司、佐
和章弘、三宅勝志、イリノテカン投与患者の実臨床における用量設定状況と設定に影響を与え
る重要因子の検討、日本薬学会年会、2016

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山中 浩泰

ローマ字氏名：Yamanaka Hiroyasu

所属研究機関名：広島国際大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：30202386

研究分担者氏名：木村 幸司

ローマ字氏名：Kimura Kouji

所属研究機関名：広島国際大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：90389106

研究分担者氏名：小林 秀丈

ローマ字氏名：Kobayashi Hidetomo

所属研究機関名：広島国際大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：70441574

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。