

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2010

課題番号：18590539

研究課題名 (和文) 院内感染防御のための臨床分離細菌の分子疫学解析

研究課題名 (英文) Molecular epidemiological analysis of the clinically isolated bacteria for the measurement of nosocomial infections

研究代表者

五味邦英 (GOMI KUNIHIDE)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：60053980

研究成果の概要 (和文)：

院内感染症の原因となる、MRSA、多剤耐性緑膿菌、ESBL 産生大腸菌、多剤耐性エンテロバクターの耐性機構を主として解析した。腸内細菌の高度耐性株からは多種類の CTX-M やメタロβラクタマーゼ遺伝子が検出された。多剤耐性緑膿菌は、複数種のメタロβラクタマーゼ遺伝子を保有していた。リネゾリド耐性 MRSA が分離され、耐性にリボゾーム RNA 領域の DNA 変異を検出した。分子疫学解析は、耐性遺伝子およびパルスフィールド電気泳動によるゲノム型解析により行った。

研究成果の概要 (英文)：

We analyzed the antibiotic resistant mechanism of bacteria responsible for nosocomial infection, such as MRSA, multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, ESBL producing *E.coli*, multidrug resistant *Enterobacter cloacae*. A variety of CTX-M genes or metallo-beta-lactamase genes were detected in highly resistant enterobacteriaceae. Various metallo-beta-lactamase genes were isolated from Multidrug resistant *P. aeruginosa*. Linezolid-resistant MRSA was isolated, and we detected the DNA mutation in rRNA region in its genome. Molecular epidemiology was performed by analyzing drug resistant gene along with genome analysis by Pulsed field gel electrophoresis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H18 年度	1,000,000	0	1,000,000
19 年度	800,000	240,000	1,040,000
20 年度	800,000	240,000	1,040,000
21 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	720,000	4,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学、院内感染

1. 研究開始当初の背景

医療関連感染症の原因として、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、*Pseudomonas aeruginosa* が多く報告されていたなか、多剤

耐性のグラム陰性桿菌である *E. coli*、*Serratia marcescens*、*Klebsiella*、*Enterobacter* の増加が諸施設から報告されていた。また、市中肺炎の原因である

Streptococcus pneumoniae や *Hemophilus influenzae* の耐性化も顕著となってきた。特に、入院加療中の易感染性患者は、これら耐性菌による重篤な感染の危険性が高い。抗菌薬耐性菌の出現状況とその耐性機構解析が耐性菌拡大防止のため必須となっていた。

2. 研究の目的

大学病院の臨床検査医学部門では、院内で分離される細菌の臨床および分子疫学的解析を、診療科横断的に行うことができる。我々は、定期的に、臨床分離細菌の出現傾向と感受性傾向を整理し、さらに院内感染の可能性がある場合には、随時にゲノム型解析および抗菌薬耐性遺伝子の解析を行い、臨床に報告することで、使用薬剤の選択や、院内感染防止に貢献してきた。

昭和大学病院においては、MRSA は 1980 年後半から急増し、当初 β ラクタム剤にのみ耐性であったものが、アミノ配糖体やテトラサイクリン系、マクロライド系抗菌薬に急速に多剤耐性化する経過を観察し得た。緑膿菌の耐性化については、1990 年代前半から多剤に高度耐性を示す株が散見されるようになり、2002 年以降には、5 類感染症原因菌とされるフルオロキノロン、カルバペネム、アミノ配糖体の 3 系統薬剤に耐性の多剤耐性緑膿菌 (MDRP) も検出され始めた。上記のごとく、当院で検出される MRSA と緑膿菌は最近の 10 年間で抗菌薬耐性化が進行し、その事実を追跡し、報告した。一方で、基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBLs) を産生する *E. coli*、あるいは *Klebsiella* は 1993 年から検出されるようになったが、MRSA や MDRP とは異なり、検出比率は必ずしも増加していない。また、メタロ β ラクタマーゼ (MBL) 産生 *Serratia* については、1996～1998 年にはカルバペネム耐性遺伝子である IMP-1 遺伝子保有株の outbreak が発生し、さらに検出されたセラチア全体の 3% 程度が IMP-1 遺伝子陽性であったが、2005 年に至るまで顕著な増加は認められていない。本研究では、院内感染発生時に即応し、発生源とその感染経路の特定を行うこと、そして、それら細菌への抗菌薬耐性遺伝子の侵淫状況を把握することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 解析対象、菌同定、感受性検査

昭和大学病院で臨床分離された株を対象とし、菌の同定と抗菌薬感受性検査には、Microscan Walkaway 96 (Siemens Healthcare Diagnostics, CA, USA) を使用し minimal inhibitory concentration (MIC) を測定した。

2) 抗菌薬耐性の表現型解析

MBL 産生能を確認するために、メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) ディスク (栄研化学, 東京) と ceftazidime (CAZ) ディスクを、ESBLs 産生能の確認には、amoxicillin/clavulanic

acid (ACV) ディスクに対する CAZ, cefotaxime (CTX), Aztreonam (AZT) および cefepime (CFPM) ディスクを使用した Double-disk synergy Test ; DDST を行った。

3) 抗菌薬耐性遺伝子解析

ESBL は CTX-M 型と SHV 型、MBL は IMP 型および VIM 型遺伝子について、PCR を行い、さらにその産物の塩基配列を決定した。

インフルエンザ菌の耐性については、ftsI 遺伝子の PCR とその塩基配列解析を行った。

4) パルスフィールド電気泳動

分離株を 20 時間平板培養後、生理食塩水で OD₆₀₀=0.6~0.7 に調製した菌液を作成し、Low melting agarose のゲルブロックを作成した。ゲルブロックの除タンパクを行ったのち、適切な制限酵素で切断した。泳動は 1% agarose gel 中で、CHEFF DRIII システム (Bio Rad) を使用した。

4. 研究成果

1) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検出率と耐性遺伝子の分析

2005 年の 1 年間に分離された 1950 株の腸内細菌科細菌の薬剤耐性検査を行い、10 株 (0.5%) がカルバペネム耐性であった。この内訳は、*S. marcescens* 142 株中 6 株 (4.2%)、*Klebsiella pneumoniae* 360 株中 1 株 (0.3%)、*Enterobacter cloacae* 215 株中 1 株 (0.5%)、*Providencia rettgeri* 14 株中 1 株 (7.1%) および *Enterobacter species* 13 株中 1 株 (7.7%) であり、SMA 抑制試験陽性で MBL 産生と判定された。PCR により、これら 10 株が blaIMP 遺伝子を保有していることを確認した。PCR 産物の塩基配列解析の結果、*E. cloacae*、*K. pneumoniae*、および *P. rettgeri* が blaIMP-1 を保有し、*S. marcescens* 6 株と *Enterobacter species* 1 株の計 7 株では blaIMP-11 を保有していることを確認した。パルスフィールド電気泳動によるゲノム型解析の結果、*S. marcescens* 6 株のうち 5 株が異なる病棟から異なる時期に分離されたにも関わらず、同一ゲノム型を示した。この結果は、blaIMP-11 の細菌の院内での定着を示唆する。これら耐性遺伝子の監視が耐性菌拡大防止のために必要であると考えた。

2) 多剤耐性緑膿菌の分離状況と MBL 遺伝子解析

2005 年 4 月～2006 年 3 月の緑膿菌分離株 923 株中、imipenem (IPM) $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ 、amikacin (AMK) $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ 、ciprofloxacin (CPFX) $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ の多剤耐性株は 23 株 (2.5%) 存在した。2 剤耐性株は、IPM および CPFX 耐性が 107 株 11.6% であった。それぞれの薬剤の耐性率は IPM, 27%、CPFX, 18%、AMK, 4% であり、AMK の耐性化が低いことにより、多剤耐性化が抑えられていると考えられた。多剤耐性株は

2004年には1.8%であり、増加傾向であった。また、IPMの耐性化は顕著であり、1993年には7.6%であったものが3倍以上に増加した。緻密な監視と拡大防止の方策が必須であると考えられた。

3) NICUにおけるMRSA解析：

2006年3月から同年10月の期間にNICU患者から分離されたMRSAのゲノム型解析を行った。13株が分離され、制限酵素SmaI消化後のパルスフィールド電気泳動の結果、11株が同一の切断パターンを示した。NICU内ではスタンダードプリコーションによる感染拡大防止が行われているが、MRSAの検出はなかなか減少しない。さらに厳密な感染防止策が必須であると考えられた。

4) ESBL産生菌の検出とその耐性責任遺伝子の解析：

2006年1月～3月に検出された*E. coli* 232株中15株、*K. pneumoniae* 135株中1株、*K. oxytoca* 46株中1株、*P. mirabilis* 21株中4株、*P. vulgaris* 7株中1株の計22株が、CTXのMIC値は64 $\mu\text{g/ml}$ 以上で、またCAZは2 $\mu\text{g/ml}$ 以下で、いずれもclavulanic acid添加により、0.12 $\mu\text{g/ml}$ 以下となり、ESBLs産生株と判定された。

CTX-M type 遺伝子解析の結果、CTX-M2型が6株、M3型が7株、M14が4株、不明4株そして、*P. vulgaris*の1株からはcumA β -lactamaseが検出された。さらに、M2, 3, 14型も全く同一の塩基配列ではなく、数塩基の置換が検出された。以上の結果、我が国でのESBLsは*E. coli*ではCTX-M type β -lactamase産生株が高頻度に分離される最近の傾向と一致した。さらに多種のCTX-M type geneが浸淫していることが明確となったことから、院内での拡大ではなく、異なる起源からの持込と判断された。第3世代セフェム耐性は、ESBLs以外にも、AmpC型セファロsporinの過剰産生やIMP-1型MBLによっても獲得されることから、その β -lactamase geneの同定を含む分子疫学解析が耐性菌の拡大防止のためにも重要と考えられた。

5) ESBL産生菌が保有するCTX-M遺伝子の安定性について

臨床分離のESBL産生菌を後日の解析のために保存し、再度起した際に耐性が欠落する現象を解析した。2006年8月～12月にESBL産生大腸菌は11株分離され、そのうち4株がパルスフィールド電気泳動パターンが同一のゲノム型を示した。4株のうち2株がCTX-M3、残りの2株がCTX-M14遺伝子を保有していた。このうちCTX-M14を保有する1株で半流動培地に保存中5ヶ月後にESBL形質を失い、CTX-M遺伝子も検出されなくなった。ESBL形質を欠落した株のゲノム型は保存前

と同一であったため、保存中に耐性遺伝子が欠落したものと判断した。菌株の保存に、選択圧を加える必要性を報告した。

6) BLNARの検出状況とPBP遺伝子解析

*Haemophilus influenzae*は小児の呼吸器感染症や髄膜炎の代表的な原因菌であるとともに、成人の市中肺炎や急性中耳炎あるいは急性副鼻腔炎の起炎菌となる。1976年に β -lactamase産生*H. influenzae*が報告された後、近年 β -lactamase非産生の抗菌薬耐性株である β -lactamase non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR)が出現し、その急激な増加が危惧されている。

今回、2004年6月から2005年3月のBLNARの分離状況を調査し、その耐性遺伝子解析を行った。The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)によれば、*H. influenzae*ではampicillin (ABPC)のMIC値が2 $\mu\text{g/ml}$ を中等度耐性、4 $\mu\text{g/ml}$ 以上を耐性としていることから、今回の検討では、ABPCに対するMICが2 $\mu\text{g/ml}$ 以上で β -lactamase非産生株をBLNARとして算定した。*H. influenzae*におけるBLNARの比率は43.2%であり、他施設からの報告と同等もしくはやや高率であった。ABPC非感受性株のうちBLNARは90%を占めており、現在の*H. influenzae*の β ラクタム薬耐性のほとんどがBLNARによることが明らかとなった。年齢別にみるとBLNAR株のうち69.7%が6歳以下から分離され、1歳で最も高頻度に検出されており、小児においてBLNAR感染が顕著であった。薬剤感受性試験の結果、BLNAR株ではcefditoren (CDTR)、levofloxacin (LVFX)、ceftriaxone (CTRX)とmeropenem (MEPM)にほとんどの株が感受性であったが、MEPMのみ、一部の株が耐性を示した。

我々はまた2006年2月から3月に分離されたBLNAR12株においてftsI遺伝子にコードされるpenicillin binding protein (PBP)3のうち、変異がBLNARにおける薬剤耐性の原因とされている保存性アミノ酸配列であるSSN領域の中3箇所とKTG領域の中2箇所の変異を中心に解析した。SSN領域とKTG領域の変異はすべてのBLNAR株に認められた。またABPC感受性株においても β ラクタム薬のMIC値が比較的高値の株でSSN領域もしくはKTG領域に変異が認められ、ABPC感受性株にもftsI遺伝子変異が起きていることが示された。第三世代セフェム系薬耐性株ではSSN領域において3箇所すべてが変異型であり耐性との関連性が示唆された。さらに、BLNAR株すべてにおいてSSN領域とKTG領域以外の領域の変異が認められ、この変異は他施設からも同様の報告がある。抗菌薬存在下では細菌の生存に有利な変異が選択されるため、こ

これらの変異もまた薬剤耐性機構に関わっている可能性がある。日常検査において *H. influenzae* の ABPC のみならず他の β ラクタム薬における MIC が上昇傾向を呈した際には *ftsI* 遺伝子変異を保有している可能性を念頭に置く必要がある。*ftsI* 遺伝子の解析が BLNAR 拡大防止のため有力な手段と考えられた。

6) 耐性 *Enterobacter cloacae* が保有する MBL の解析

2008 年 4 月～6 月に連続して検出された *E. cloacae* のうち、CTX, CAZ あるいは AZT のいずれかに耐性を示す株を多剤耐性と定義し耐性機構の解析を行った。遺伝子解析で、MBL と ESBL を検出し、その中に MBL と ESBL の両方を保有する株が存在した。表現型解析の目的で SMA と CAZ ディスクによる DDST および、clavulanic acid と CAZ, CTX, AZT, CFPM ディスクによる DDST により、MBL と ESBL および AmpC の鑑別を行った。表現型で ESBL と判定された 5 株からはすべて CTX-M 型遺伝子が検出され、CTX-M3 が 3 株、CTX-M14 gene が 2 株であった。SMA で MBL の表現型を示した 7 株のうち 6 株からは IMP 遺伝子が検出された。このうち、CTX-M3 を保有していた 1 株は、IMP-1 遺伝子も保有していた。

E. cloacae の薬剤耐性は、本来保有している AmpC 型 β lactamase の高発現による多剤耐性化もあることから、耐性化機構の解析は複雑であるが、今回、MBL と ESBLs の侵淫も明らかとなった。分子疫学を適用し耐性菌拡大防止を行う必要がある。

7) リネゾリド(LZD)耐性 MRSA の耐性解析

2007 年 12 月に当院で始めて LZD の MIC 値が 8 を超える耐性株を分離した。同時期に同一病棟で分離された MRSA のゲノム型解析を行ったところ、3 症例で同一であった。このうち、2 症例の株は LZD 耐性で、1 症例では LZD 感受性であった。LZD 耐性株が分離された症例は、長期間にわたり LZD 投与を受けており、院内で耐性獲得したものと考えられた。LZD 耐性に関するリボゾーム RNA 領域のドメイン V の塩基配列を解析したところ、耐性変異 (G2576T) が検出された。LZD 耐性 MRSA の出現と拡大を阻止するためにも分子疫学解析が必要となる。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 高橋奈々子, 山口史博, 陳 戈林, 安原努, 伊藤里歩, 和久田梨香, 福地邦彦

昭和大学病院で分離された多剤耐性

Enterobacter cloacae の耐性遺伝子解析

臨床病理 58 :442-447. 2010

2. 福地邦彦:多剤耐性緑膿菌. 昭和医学会雑誌 69 : 225-231 2009

3. 山口史博, 黒田高明, 安原努, 和久田梨香, 福地邦彦, 五味邦英:昭和大学病院における β -lactamase 非産生 ampicillin 耐性 *Haemophilus influenzae* の検出状況および PBP3 遺伝子解析 . 臨床病理 56(8)662-670. 2008

4. Md. Shafiqur Rahman, Katsumi Mizuno, Kunihiko Fukuchi, Kazuo Itabashi Investigation of the origin of MRSA Infection with Pulsed Field Gel Electrophoresis in the NICU Showa University Journal of Medical Sciences 20(1):41-47. 2008

5. 黒田高明, 福地邦彦 : 昭和大学病院におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の検出率と耐性遺伝子の分析. 昭和医学会雑誌 68(1) :55-60. 2008

[学会発表] (計 10 件)

1. 壇辻百合香、花木秀明、竹末芳生、賀来満夫、朝野和典、三嶋廣繁、福地邦彦、本田順一、柳原克紀、二木芳人: 同一施設の 2 症例から分離された耐性変異が異なる 2 株の Linezolid 耐性 MRSA. 第 83 回日本感染症学会総会 東京 2009, 4 感染症学雑誌 臨時増刊号 83 巻 p. 220

2. 杉本太路、陳 戈林、仲間恵美子、福地邦彦、木村聡: 当院におけるメタロ β ラクタマーゼ産生菌検出症例の臨床的背景. 第 55 回日本臨床検査医学会総会 名古屋 2008, 11 臨床病理 vol. 56 補冊 p. 286

3. 松尾奈々子、安原努、陳 戈林、和久田梨香、福地邦彦、五味邦英: 耐性 *Enterobacter Cloacae* が保有するメタロ β ラクタマーゼの解析. 第 55 回日本臨床検査医学会総会 名古屋 2008, 11 臨床病理 vol. 56 補冊 p. 285

4. 松平真悟、仲間恵美子、原田裕子、峰村純子、福地邦彦、木村聡: 2 つの基幹病院における緑膿菌の薬剤感受性. 第 55 回日本臨床検査医学会総会 名古屋 2008, 11 臨床病理 vol. 56 補冊 p. 284

5. 二木芳人、小司久志、吉田耕一郎、黒川真嗣、足立満、福地邦彦、中根香織、和久田梨香: リネゾリド耐性 MRSA の臨床分離とその背景因子. 第 56 回日本化学療法学会総会 2008, 6 岡山 第 56 回日本化学療法学会総会 特集号 vol. 56 supplement-A 2008 p. 192

6. 伊藤里歩、和久田梨香、陳 戈林、福地邦彦、高木康: 保存中に ESBL 表現型を失った CTX-M 保有 *E. coli* について. 第 19 回日本臨床微生物学会総会 2008 東京. 日本臨床微生物

学会総会 プログラム・抄録集 Vol.17 No.4
2007 p.142

7. 福岡清二、和久田梨香、陳 戈林、福地邦彦：昭和大学病院におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌の検出動向. 第18回日本臨床微生物学会総会 長崎 2007,2 日本臨床微生物学雑誌 vol.16 No.4 プログラム・抄録集 p.85

8. 黒田高明、山口史博、福地邦彦、五味邦英：昭和大学病院におけるカルバペネム耐性腸内細菌のメタロβラクタマーゼ遺伝子解析. 第53回日本臨床検査医学会総会 弘前 2006,11 臨床病理 vol.54 補冊p.225

9. 山口史博、黒田高明、安原努、陳 戈林、和久田梨香、福地邦彦、五味邦英：昭和大学病院におけるBLNARの検出状況とPBP遺伝子解析. 第53回日本臨床検査医学会総会 弘前 2006,11 臨床病理 vol.54 補冊p.226

10. 伊藤里歩、和久田梨香、吉田勝彦、田辺佐江、Md Shafiqur Rahman、陳 戈林、高木 康：昭和大学病院におけるESBL産生菌の検出とその耐性責任遺伝子の解析
第53回日本臨床検査医学会総会 弘前 2006,11 臨床病理 vol.54 補冊 p.226

〔図書〕計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

五味邦英 (Kunihide Gomi)

研究者番号：60053980

(2)研究分担者

陳 戈林 (Gelin Chen)

研究者番号：60266111

福地邦彦 (Kunihiko Fukuchi)

研究者番号：70181287

(3)連携研究者

()

研究者番号：