

「緑膿菌の耐性に関する調査報告」

総合報告書

【調査目的】

耐性菌には MRSA や多剤耐性緑膿菌などは以前からよく知られているが、近年では新たにメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生グラム陰性菌、基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生グラム陰性菌、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌などが出現し、その詳細な実態については未だわからない状況にある。滋賀県では毎年 1 種類の耐性菌についてのサーベイランスを行い各医療施設にデータを還元することにより、有効な院内感染防止対策について支援することを目的として、第 1 回目の前年度は ESBL 産生グラム陰性菌の調査を行った。第 2 回目の今年度は本邦において非常に問題となっている緑膿菌を対象として調査した。

【調査方法】

1) 調査対象耐性菌：緑膿菌。

メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生緑膿菌および多剤耐性緑膿菌 (MDRP) の調査。

2) 調査期間：平成 19 年 9 月 1 日から 11 月 30 日までの 3 ヶ月間。

3) 菌株収集方法：薬剤感受性検査を実施した緑膿菌について、セフトジジム (CAZ)、イミペネム (IPM)、またはメロペネム (MEPM)、アミカシン (AMK) およびシプロフロキサシン (CPFX) またはレボフロキサシン (LVFX) の抗菌薬のいずれかに耐性または中間の成績が得られた菌株をカジトン培地に保存した。1 患者について同一部位から複数回分離された場合は 1 菌種につき 1 株を対象としたが、2 回目以降の感受性検査の成績に変化が認められた場合は収集した。調査期間終了後、菌株を滋賀県立成人病センター 臨床検査部 微生物検査室へ送付願った。

4) 試験・検査の内容：

① MBL 産生緑膿菌の検出

各施設における薬剤感受性検査において CAZ が中間 (I) または耐性 (R) の株について、メルカプト酢酸ナトリウムを利用した SMA ディスク (栄研化学) を用いディスク拡散法により阻害試験を実施した。CAZ、IPM およびセフェピム (CFPM) のいずれかの薬剤に阻害帯が形成された場合を陽性とした。

② MDRP の検出

薬剤感受性検査において IPM、AMK および CFX に耐性となった場合を陽性とした。

③ PCR 法によるメタロー β ラクタマーゼ遺伝子の検出

MBL 耐性遺伝子の検出を IMP-1、IMP-2 および VIM の遺伝子型について行った。DNA の抽出はハートインフュージョン寒天培地で 35℃、24 時間培養後、キアゲン DNA Mini-Kit を用いた。PCR 試薬は rTaq DNA polymerase を用いた。PCR 反応条件は 94℃60 秒、55℃60 秒、72℃60 秒の計 30 サイクルで増幅し、その産物を 2%アガロースゲル電気泳動で確認した

④ RAPD 法による分子疫学的解析

Random amplification of polymorphic DNA(RAPD)によって菌種間の遺伝子レベルの相同性を比較検討した。使用プライマーは 272 (5-AGCGGGCCAA-3) を用いた。②で抽出した DNA および PCR 試薬を用い、Mg²⁺濃度は 25mM とした。PCR 反応条件は 94℃60 秒、34℃60 秒、72℃60 秒の計 35 サイクルで増幅し、その産物を 2%アガロースゲル電気泳動で確認した。

【成績】

1) 参加医療施設

滋賀県の医療施設 61 施設のうち、サーベイランスに参加したのは 29 施設であり、昨年度の基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生グラム陰性菌に関する調査より 3 施設少なかった。病床別の参加施設数は 199 床以下が 15 施設、200~499 床が 9 施設、500 床以上が 5 施設であった。(表 1)

表 1. 参加状況

病床数	1~199	200~499	500~	全体
該当施設数	37	17	7	61
参加希望施設数	15	9	5	29
参加施設数	15	9	5	29

2) 緑膿菌の耐性に関する成績

緑膿菌の耐性に関する成績を表 2 に示した。対象となった 784 株の耐性株数は CPFX 耐性が最も多く 104 株 (13.3%)、次いで IPM 耐性 85 株 (10.8%)、CAZ 耐性 40 株 (5.1%) および AMK 耐性 21 株 (2.7%) の順であった。これら耐性株から CAZ 耐性を除き 1 剤耐性、2 剤耐性および 3 剤耐性 (MDRP) の 3 パターンと MBL 産生株についてまとめた。1 剤耐性は CPFX 耐性が最も多く 50 株 (6.4%)、次いで IPM 耐性 38 株 (4.8%)、AMK 耐性 4 株 (0.5%)、2 剤耐性は IPM+CPFX 耐性が最も多く 36 株 (4.6%)、次いで AMK+CPFX 耐性 7 株 (0.9%)、IPM+AMK 耐性 1 株 (0.1%) の順であった。MDRP は 10 株 (1.3%) であった。MBL 産生株は 10 株 (1.3%) に認めた。

表 2. 緑膿菌の耐性に関する成績

		株数
依頼検体総数		19715
対象株総数		784
CAZ 耐性株数		40
IPM 耐性株数		85
AMK 耐性株数		21
CPFX 耐性株数		104
1 剤耐性	IPM 耐性株数	38
	AMK 耐性株数	4
	CPFX 耐性株数	50
	1 剤耐性総数	92
	(%)	11.7
2 剤耐性	IPM+AMK 耐性株数	1
	IPM+CPFX 耐性株数	36
	AMK+CPFX 耐性株数	7
	2 剤耐性総数	44
	(%)	5.6
MDRP	IPM+AMK+CPFX 耐性株数	10
	(%)	1.3
MBL	陽性株数	10
	(%)	1.3

3) 病床別成績

病床別成績を表3に示した。1剤耐性は199床以下が5株(4.7%)、200~499床が26株(9.8%)、500床以上が61株(14.8%)、2剤耐性はそれぞれ3株(2.8%)、9株(3.4%)、32株(7.7)で、1剤耐性および2剤耐性ともに500床以上の施設で高かった。MDRPおよびMBL産生株は500床以上で両者とも10株(2.4%)に認められたが、199床以下および200~499床では認めなかった。

表3. 病床別成績

		<199	200-499	>500	全体
施設数		15	9	5	29
検体数		1842	6934	10939	19715
対象株数		106	265	413	784
1剤耐性	株数	5	26	61	92
	%	4.7	9.8	14.8	11.7
2剤耐性	株数	3	9	32	44
	%	2.8	3.4	7.7	5.6
MDRP	株数	0	0	10	10
	%	0	0	2.4	1.3
MBL陽性	株数	0	0	10	10
	%	0	0	2.4	1.3

4) 入院・外来別成績

入院・外来別の成績を表4に示した。外来は1剤耐性14株、2剤耐性4株、MDRP0株、入院はそれぞれ78株、40株、10株と入院で多く検出された。

表4. 入院・外来別の成績

耐性数	外来	入院	全体
1剤耐性	14	78	92
2剤耐性	4	40	44
MDRP	0	10	10
合計	18	128	146

5) 診療科別成績

診療科別の成績を表5に示した。内科系は1剤耐性45株、2剤耐性13株、MDRP3株、外科系はそれぞれ33株、18株、4株、その他・不明はそれぞれ14株、13株、3株でいずれの診療科からもMDRPが検出された。

表5. 診療科別の成績

耐性数	内科系	外科系	その他・不明	全体
1剤耐性	45	33	14	92
2剤耐性	13	18	13	44
MDRP	3	4	3	10
合計	61	55	30	146

6) 検査材料別成績

検査材料別の成績を表6に示した。検出材料は全体で泌尿器系材料（主に尿）が最も多く65株（44.5%）、次いで呼吸器系材料52株（35.6%）、消化器系材料8株（5.5%）、血液2株（1.4%）、その他19株（13.0%）の順であった。MDRPは呼吸器系で5株と最も多く、次いで泌尿器系2株、消化器系1株、その他2株に認めた。血液からは1剤耐性および2剤耐性をそれぞれ1株認めたがMDRPは認めなかった。

表6. 検査材料別の成績

菌種	検査材料					全体
	呼吸器系	泌尿器系	消化器系	血液	その他	
1剤耐性	32	40	7	1	12	92
2剤耐性	15	23	0	1	5	44
MDRP	5	2	1	0	2	10
合計	52	65	8	2	19	146

7) 耐性遺伝子の結果

MBLの耐性遺伝子の成績を表7に示した。MBL10株のうち、MDRPは7株、2剤耐性が2株、1剤耐性が1株であった。耐性遺伝子はすべてIMP-1型であり、IMP-2型およびVIM型は認めなかった

表7. 耐性遺伝子の成績

耐性数	対象株数	MBL 陽性株数	MBL 耐性遺伝子		
			IMP-1	IMP-2	VIM
1 剤耐性	92	1	1	0	0
2 剤耐性	44	2	2	0	0
MDRP	10	7	7	0	0
合計	146	10	10	0	0

8) 分子疫学的解析結果

2剤耐性および3剤耐性の54株についてRAPD法を実施したところ、21パターンに分類された。同一パターンを示したのは5施設であった。(表8)施設No.20は2剤耐性(IPM+CPFX)の8株が同一パターンを示し、4病棟から検出され、さらには外来からも検出された。他の4施設はそれぞれ2パターンに分類された。施設No.16では、9株中5株はMBL産生のMDRPであり、すべて同一パターンとなった。さらに、残りの4株は2剤耐性(IPM+CPFX)となり、所属はそれぞれ異なるものの、すべて同一パターンとなった。施設No.17では2剤耐性(IPM+CPFX)を6株に、施設21では5株に認め、2パターンに分類された。MBL産生型MDRPが検出された施設No.18では、耐性パターンは異なるものの、RAPD法では同一パターンを示した。

表8. RAPDが同一パターンを示した、2剤(IPM+CPFX)、MDRP、MBLの施設別成績

RAPD タイプ	耐性パターン	耐性遺伝子	施設 No.	所属*(株数)
1	IPM,AMK,CPFX	IMP-1	16	A(4), B(1)
2	IPM,CPFX	-	16	C(1), D(1), E(1), 外来(1)
3	IPM,CPFX	-	17	F(2), G(2)
4	IPM,CPFX	-	17	G(1), H(1)
5	IPM,AMK,CPFX	IMP-1	18	I(1), J(1)
5	IPM,CPFX	IMP-1	18	K(1)
6	IPM,CPFX	-	20	L(4), M(1), N(1), O(1), 外来(1)
7	IPM,CPFX	-	21	P(2)
8	IPM,CPFX	-	21	Q(2), R(1)

*所属；実際の所属名ではなく、記号で示した。

【まとめ】今回、第2回目の耐性菌サーベイランスは緑膿菌を対象として MBL および MDRP の調査を実施した。61 施設中 29 施設の参加があり、784 株が収集された。検査材料別の成績では泌尿器系と呼吸器系から多く検出された。MBL および MDRP とともに 784 株中 10 株 (1.3%) に検出され、MBL 産生型 MDRP は 10 株中 7 株に認め、すべて入院患者由来であった。2 剤耐性は 44 株 (5.6%) であり小・中規模病院からも検出された。今後、抗菌薬の使用状況により、小・中規模病院においても多剤耐性化が懸念される。近畿地区 13 施設における MBL 疫学調査 (近畿耐性菌研究会成績)¹⁾ では、6,198 株中 22 株 (0.4%)、兵庫県内 29 施設の MDRP 疫学調査²⁾ では 766 株中 7 株 (0.9%) であり、両者と比較し高い成績であった。検出された施設は MBL および MDRP とともに 500 床以上の施設からで、大規模施設の成績が押し上げた結果となった。しかし 100 床あたりの 3 ヶ月間の検体数は、500 床以上では、199 床以下の 4 倍、499 床以下の 2.5 倍の検体数であり、検査件数が多かったことも一つの要因と考えられたが、患者個々の臨床背景を調査し検討する必要もある。

MBL および MDRP の臨床背景の特徴は、ほとんどが入院患者からで、高齢者で寝たきり、コンプロマイズドホストに多く検出され、広域スペクトラム薬の前投与歴が多い。検出検体は泌尿器検体が多くデバイス留置が高率である。病状は感染所見が多いとする報告や、保菌例が多いとする報告がある。^{3) 4)} さらに今回の成績でも示すように、検出される施設に偏りが見られ院内での感染を示唆する特徴が挙げられる。これら臨床背景は、大規模施設だけではなく小・中規模施設にもあてはまると考えられる。今回検出されなかった施設においても MBL および MDRP の検出状況に注意する必要がある。

分子疫学的解析の結果では、5 施設に同一パターンを認め病棟を越えて拡散していた。MBL 産生型 MDRP であったのは 2 施設に認めた。前年度の ESBL 産生グラム陰性桿菌の調査では、プロテウス・ミラビリスにおいて地域レベルで拡散したと思われるデータが得られたが、今回は施設から施設への拡散の可能性は認めなかった。

近年、MDRP による死亡例を含めた幾つかのアウトブレイクの報告を認める。経食道エコープローブが感染源となった例もあるが、多くは尿路および水周りに関連したところが感染源となっている。このことから、蓄尿は可能な限り禁止し水周りは清潔にすべきとの報告が多い。

国立感染症研究所のホームページによると、MDRP が蔓延するしくみとして、多くは他施設からの患者さんなどにより持ち込まれ、接触感染により医療施設内に広がるとしている。MDRP には MBL 産生型と MBL 非産生型があり、MBL 産生型 MDRP はほぼすべての抗菌薬に耐性を示し、患者さんが腸管内などに保有する別の緑膿菌にプラスミドの伝達により耐性遺伝子をばら播きつつ、ネズミ算式に増殖する。MBL 産生型 MDRP が、同一施設内で複数の患者さんから検出された場合は、細菌学的には「院内感染で広がった。」と考えて調査や対策を講じる必要がある。耐性菌を蔓延させないため、耐性菌の出現の早期発見、接触感染予防対策の徹底、耐性菌の拡散の選択圧とならないよう、各施設でのサーベイランスと抗菌薬の適正使用が重要であると指摘している。

治療薬については、ブレイクポイント・チェッカーボード・プレートが販売され、有効薬剤をほとんど認めなかった MDRP に対して併用療法を選択することができるようになった。しかし依然として有効薬剤が少ないのが現状である。最も抗菌力のあるコリスチンは、国内では保険適用がなく販売されていない。入手するには外国から輸入しなければならず、1 施設では困難が予想される。このことから今後院内感染防止対策だけではなく、治療薬に関しても県レベルで取り組む必要があると思われる。

調査担当者	西尾 久明（滋賀県立成人病センター 臨床検査部 微生物検査室）
	末吉 範行（社会保険滋賀病院 検査部 微生物検査室）
報告責任者	井上 徹也（社会保険滋賀病院 血液内科）

<参考文献>

- 1) Nishio H, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, *et al.* : Metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli : laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki Region of Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2004 ; 42 : 5256-63.
- 2) 幸福知己, 岡崎知美, 藤原美樹ほか : 兵庫県における臨床分離力膿菌の各種注射用抗菌薬に対する感受性サーベイランス. *Jap J Antibiot* 58 : 459-468. 2005.
- 3) 中野哲治, 平松和史, 平田範夫, 村上純子, 一宮朋来, 時松一成, その他 : メタロ β -ラクタマーゼ遺伝子 bla_{IMP} 陽性グラム陰性桿菌検出症例の臨床的検討. *感染症誌* 2001 ; 75 : 946-54.
- 4) 安達桂子, 櫻田政子, 安中めぐみ, 上條仁子, 畠山 勤, 稲松考思, その他 : メタロ β -ラクタマーゼ産生性 *Serratia marcescens* 検出例の検討. *日臨微誌* 1999 ; 9 : 244-50.

MDRP（多剤耐性緑膿菌）および MBL（メタロ-β-ラクタマーゼ）産生菌についての基礎知識

1) MDRP とは

多剤耐性緑膿菌（multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* : MDRP）とは、カルバペネム系、アミノグリコシド系およびフルオロキノロン系の3系統の抗菌薬に耐性の緑膿菌で、具体的には IPM の MIC : $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ 、AMK の MIC : $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ および CPMX の MIC : $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ の条件を満たす緑膿菌と定義される。MDRP 感染症は感染症法 5 類定点把握として届出が必要になる。検出材料は泌尿器検体が最も多く、次いで呼吸器検体で血液などからも検出されることがある。保菌例として検出されることが多いが、発症した場合はほとんどの抗菌薬に耐性であるため治療に難渋することが多い。検出された場合は、可能な限り隔離することが望ましい。

2) MBL 産生菌とは

メタロ-β-ラクタマーゼ（metallo-β-lactamase : MBL）産生菌とは、Ambler の分類では ClassB に属し、酵素の活性中心に亜鉛などの金属イオンをもつ。MBL はカルバペネムを含むすべてのβ-ラクタム薬を分解する強力な酵素であるが、アズトレオナム（AZT）に感受性を示すことが多い。MBL 遺伝子は染色体上または伝達性のあるプラスミド上に保有しており、後者のプラスミド性の MBL が問題となる。染色体性 MBL の代表的な菌種はステノトホロモナス・マルトフィリアで、カルバペネムを含む多くの抗菌薬に耐性を示す。プラスミド性 MBL の代表的な菌種は、緑膿菌、セラチアで、他にアシネトバクター、シュードモナス・プチダなどがある。遺伝子型の多くは IMP-1 型で、他に IPM-2 型、VIM-2 型などがある。プラスミド性 MBL 耐性遺伝子はインテグロンと呼ばれる構造の中にある。このインテグロンは、インテグラーゼという酵素の働きにより薬剤耐性遺伝子や消毒剤耐性遺伝子などの耐性遺伝子カセットを次々に取り込むことができるため、高度耐性を獲得しやすい。

3) MBL 産生型 MDRP と MBL 非産生型 MDRP について

MBL 産生型および MBL 非産生型 MDRP は、アミカシン、フルオロキノロンに高度耐性を示す。MBL 非産生型は第三世代セファロsporinやセファマイシン等に対して効果が期待できる場合があり、イミペネムに対しても低発現型 D2 ポリン遺伝子（染色体性）の関与により低度耐性を示す。一方、MBL 産生型は MBL の遺伝子（多くはプラスミド性）によりイミペネムに高度耐性を示し、ほぼすべての抗菌薬に耐性を示す。さらにプラスミドにより他の緑膿菌などに耐性遺伝子をばら播きつつ、ネズミ算式に増殖する。

4) MBL および MDRP の臨床背景の特徴と院内感染対策

高齢者で寝たきり、コンプロマイズドホストに多く検出され、検出検体は泌尿器検体が多くデバイス留置が高率である。感染源としては尿路および水周りに関連した医療器具や環境に多く棲息する。このことから、蓄尿は可能な限り禁止し水周りは清潔にすることが望まれる。保菌例として検出されることが多いが、発症した場合はほとんどの抗菌薬に耐性であるため治療に難渋する。検出された場合は可能な限り隔離し、標準予防策に加え、接触予防策を徹底する必要がある。

Ambler の分類

分類		ペニシリン	セファロsporin				セファマイシン	モノバクタム	カルバペネム
			第 1	第 2	第 3	第 4			
クラス A	染色体性	○	○						
	ESBL	○	○	○	○	○		○	
クラス B		○	○	○	○	○			○
クラス C		○	○	○	○		○	○	
クラス D		○	○	(○)	(○)	(○)			

○：耐性を示す。() は酵素によって耐性を示すものがある。