

課題番号 : 25指206

研究課題名 : 迅速薬剤耐性因子検出法を用いた重症細菌感染症の高度抗菌剤療法による先進医療

主任研究者名 : 秋山 徹

分担研究者名 : 大曲 貴夫

キーワード : 薬剤耐性、迅速診断

研究成果 :

センター研究所ではイムノクロマト法を用いて、アミノグリコシド及び IMP 型メタロβラクタマーゼ薬剤耐性遺伝子を 15 分で検出できるキットを開発し、本キットは特許出願済で研究用試薬として販売されている。本キットを用いて実際の臨床でこれらの薬剤耐性因子の診断を行い、薬剤耐性因子の診断率や抗生剤の適切な選択といった臨床的有効性について検討する。

研究目的：本臨床試験は、アミノグリコシド及び IMP 型メタロβラクタマーゼ薬剤耐性因子を 15 分で検出できるキットを用いて薬剤耐性菌による敗血症が疑われる患者の検体において、上記の薬剤耐性因子産生の有無を診断し、薬剤耐性遺伝子の診断率や抗生剤の適切な選択といった臨床的有効性について検討する。また上述以外の新規耐性因子向けのキット開発を実施する。

必要性：敗血症の治療では、起因菌の迅速同定は適切な抗菌薬治療を開始するまでの時間を短縮し、患者死亡率の低下や入院日数の短縮につながる事が報告されている。また、血液培養の結果に基づく抗菌薬の変更は経験則的な治療を継続するよりも効果的であり、さらに、適切な抗菌薬に変更できれば、最初から適切な治療を施した場合と比較して患者の死亡率に大きな違いは生じないことも報告されている。そのため検体提出から感受性試験結果取得までの時間を短縮する迅速診断検査法の開発が臨床上極めて重要である。

期待される成果：敗血症の治療では起因菌に有効な抗生物質を投与することが第一であり、そのためには薬剤耐性因子などの迅速かつ確実な敗血症の診断が必須である。現時点における一般的な敗血症の診断法としては、培地に患者から採取した血液を混合し、一定時間培養して菌の発育を確認する血液培養法が行われている。しかし、血液培養で得られる結果は血中の菌の有無（陽性または陰性）のみであり、起因菌の同定には追加処理が必要である。追加処理として、一般的には、血液培養で陽性となった検体を種々の培地に移植して同定培養を行う方法がとられる。このような一連の操作に要する総時間は、多くの施設で最短でも 3～4 日（検体採取から菌の選択的分離：1～2 日、増菌：1 日、同定操作：1 日以上）である。

これは、最適な治療法を選択するのに3~4日かかることを意味する。敗血症治療では、迅速かつ確実な診断に基づき、最適な抗菌薬の投与を一刻も早く開始する必要があるにもかかわらず、実態としては、一般的な敗血症の検査診断方法では必ずしも十分に対応できていない。本研究で有効性評価を行う免疫クロマト法では、血液培養が陽性となった時点、もしくは分離培養から標的薬剤耐性因子産生の有無を15分で判定可能である。そのため起因菌に有効な薬剤を通常検査よりも96~72時間速く選択できる可能性を提供し、患者予後の向上、具体的には救命率向上や入院期間短縮といった効果が期待できる。筆者等はアミノグリコシド及びIMP型メタロβラクタマーゼ薬剤耐性因子を15分で検出できるキットを開発し、同キットは特許出願済で研究用試薬として販売されている。同キットを用いて臨床現場で同薬剤耐性因子の診断を行い、薬剤耐性因子の診断率や抗生剤の適切な選択といった臨床的有効性について検討する。

研究方法：1) 予備的疫学研究：2011年から2012年間に日本の39都道府県、190病院から分離された緑膿菌を対象に、本キットによる解析を行った。

2) グラム陰性菌菌血症例におけるIMP/Iae・Ib薬剤耐性因子検出キットの有用性の検討：入院後72時間以上経過し、血流感染症が疑われる入院患者から採取された血液検体を、従来法に従って血液培養検査を行った。血液培養自動分析装置にて陽性と判定された好気性血液培養ボトル検体に対し、従来法に従ってグラム染色を行う。グラム染色にて陰性菌と判断された検体を従来法に従って分離培養し、菌種同定と薬剤感受性試験を行った。また、グラム染色で陰性菌と判断された検体は従来法による分離培養操作と並行して本キットによる判定も行った。本キットでIMP, Iae, Ibのいずれかが陽性と判定された血液検体から同定された菌株または従来法において同定された細菌の感受性検査結果がカルバペネム系抗菌薬またはアミノグリコシド系抗菌薬に耐性と判定された菌株は、後日PCR(polymerase chain reaction: ポリメラーゼ連鎖反応遺伝子増幅法)を用いてblaIMP 遺伝子、aac(6')-Iae 遺伝子、aac(6')-Ib 遺伝子を検査し本キットとの一致性を検討する。また、本キットですべて陰性と判定され、従来法の感受性検査結果でもカルバペネム系およびアミノグリコシド系に感受性と判定された菌株についてもPCRを用いて遺伝子検査を行い本キットとの一致性を検討する。薬剤

耐性遺伝子の同定が不一致の場合、当該耐性遺伝子の遺伝子配列を決定し、遺伝子型を決定し、不一致の原因を明らかにする。研究期間は2014年9月1日から2015年8月31日までとする。

研究成果：1) 予備的疫学研究：2011年から2012年間に日本の39都道府県、190病院から分離された緑膿菌を対象に、本キットによる解析を行った。IMP、AAC(6')-Iaeもしくは-Ibを有する緑膿菌の割合は、2011年の56.7%(170/300)から2012年の78.8%(230/300)まで増加しており、このうちIMPとAAC(6')-IaeもしくはIMPとAAC(6')-Ibを同時に産生する株の割合は、2011年の78.8%(134/17)で2012年には77.8%(179/230)であった。またこれらの耐性機構を有する株のβラクタム系薬剤に対するMICは、耐性機構を有さない株と比較し目立って高かった。これらの結果は、IMP、AAC(6')-Iaeもしくは-Ibを産生する緑膿菌が日本全国に広がっていることを示し、これらの耐性因子が日本における多剤耐性緑膿菌をモニタリングするための重要なマーカーであることが示された。βラクタム系薬剤、アミノグリコシドおよびフルオロキノロンの3系統の薬剤に耐性の多剤耐性緑膿菌が出現し、日本では大きな問題となっている。特に多剤耐性(MDR)株による緑膿菌感染症の院内集団発生は日本始め多くの国で報告されている。日本で頻回に分離される多剤耐性緑膿菌は、高頻度にIMP型メタロβ-ラクタマーゼおよび/またはアミノグリコシド6'-Nアセチルトランスフェラーゼ[AAC(6')]-Iae and -Ibを産生している。これらの耐性機構を有する緑膿菌を検出するため、IMP型メタロβ-ラクタマーゼとアミノグリコシド6'-Nアセチルトランスフェラーゼ[AAC(6')]-Iae and -Ibの検出のための免疫クロマトグラフィアッセイキットが開発された。これらの免疫クロマトグラフィアッセイの結果はPCR法の結果と完全に一致することが明らかとなった。これらの成果は以下のように論文に発表された。

2) グラム陰性菌菌血症例におけるIMP/Iae・Ib薬剤耐性因子検出キットの有用性の検討：

2014年11月28日より研究を開始。2015年6月15日時点で46症例が登録。1検体でイムノクロマトグラフィ法においてIMP陽性であった(PCRは未施行)。本研究は2015年10月31日まで継続予定である。

1: Tojo M, Tada T, Shimojima M, Tanaka M, Narahara K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Ohmagari N. Dissemination in Japan of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae/AAC(6')-Ib. *J Infect Chemother*. 2014 Sep;20(9):586-8.

2: Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, Sugiki Y, Kuroda E, Kubota S, Takeshita N, Kutsuna S, Tojo M, Ohmagari N. Molecular and epidemiological characterization of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a Large tertiary care hospital in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jun;58(6):3441-50.

Subject No. : 25A206

Title : Advanced medical care for severe infectious diseases with rapid drug antibiotic resistance factor detection.

Researchers : Tohru Miyoshi-Akiyama, Norio Ohmagari

Key word : drug-resistance, rapid diagnosis

Abstract :

Dissemination in Japan of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae/AAC(6')-Ib.

Although *Pseudomonas aeruginosa* is intrinsically sensitive to β -lactams (e.g., ceftazidime [CAZ] and imipenem [IPM]), aminoglycosides (e.g., amikacin [AMK] and tobramycin), and fluoroquinolones (e.g., ciprofloxacin [CIP] and ofloxacin [OFX]), *P. aeruginosa* resistant to these antibiotics has emerged and is widespread. Nosocomial outbreaks of *P. aeruginosa* infection, particularly by multidrug-resistant (MDR) strains, have become more frequent in various countries, including Japan and. MDR *P. aeruginosa* isolates in Japan frequently produce IMP-type metallo- β -lactamases (MBLs) and/or aminoglycoside 6'-N-acetyltransferases [AAC(6')s]-Iae and -Ib. We recently designed immunochromatographic assay kits for the detection of IMP-type MBLs and AAC(6')-Iae and -Ib. Clinical assessment showed that the results of these immunochromatographic assays were fully consistent with those of PCR analyses. The aim of the study is to elucidate the spread of antibiotic-resistance factors in MDR *P. aeruginosa* isolates throughout Japan.

Bacterial species were identified with the MicroScan WalkAway system and MicroScan breakpoint panels (Siemens Healthcare Diagnostics, Tokyo, Japan). Drug susceptibility was determined qualitatively as sensitive (S), intermediate (I) or resistant (R) using MicroScan breakpoint panels (Siemens Healthcare Diagnostics) consistent with the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). MDR *P. aeruginosa* isolates were defined as isolates resistant to imipenem (IPM), amikacin (AMK) and ciprofloxacin (CPFX) using the breakpoint panels in the study. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of CAZ, cefepime (CFPM), meropenem (MEMP), panipenem (PAPM), doripenem (DRPM), IPM, CPFX, levofloxacin (LVFX), AMK, and arbekacin (ABK) were determined by a broth microdilution

Researchers には、分担研究者を記載する。

method with dry plate (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Values of MICs at which 50% and 90% of the isolates were inhibited (MIC50 and MIC90, respectively) were determined.

The distributions of MDR *P. aeruginosa* isolates producing IMP, AAC(6')-Iae and AAC(6')-Ib in 2011 and 2012 are shown in Table 1. Of the 300 isolates obtained during 2011, 170 (56.7%) were positive for the production of an IMP, AAC(6')-Iae or AAC(6')-Ib. In comparison, 230 of the 300 (76.7%) isolates obtained during 2012 were positive for the resistance factors, which was a significant increase over the rate in 2011 ($P < 0.01$). Of these positive isolates with at least more than one resistance factor, IMP and AAC(6')-Iae co-producers were the most prevalent in 2011 and 2012. In addition, these IMP and AAC(6')-Iae co-producers significantly increased from 28.7% of all MDR *P. aeruginosa* isolates tested in 2011 to 41.7% in 2012 ($P < 0.01$). Producers with other combinations of resistance factors did not increase or decrease significantly between 2011 and 2012.

Table 1. Drug resistance factors in MDR *P. aeruginosa* isolates in Japan.

Year	Drug resistant factors						Total
	IMP+ AAC(6')-Iae	IMP+ AAC(6')-Ib	IMP	AAC(6')-Iae	AAC(6')-Ib	Negative	
2011	86 (28.7%)	48 (16%)	5 (1.6%)	2 (0.6%)	29 (9.7%)	130 (43.3%)	300
2012	125 (41.7%)	54 (18%)	11 (3.6%)	10 (3.3%)	30 (10%)	70 (23.3%)	300

Since most of the MDR *P. aeruginosa* isolates produced both IMP and AAC(6')-Iae or both IMP and AAC(6')-Ib, we compared the drug susceptibility of these isolates in 2012 with that of the isolates not producing these factors (Table 2). The MIC50 and MIC90 of cephalosporins and carbapenems were markedly higher for the isolates that did than did not produce these factors. There were no marked between group differences in the MIC50 and MIC90 of fluoroquinolones. The MIC50 of AMK, but not ABK, was significantly higher for

isolates producing both IMP and AAC(6')-Iae than for other groups. Similar results were observed for strains isolated in 2011 (data not shown).

Table 2. Drug susceptibility test of MDR *P. aeruginosa* isolates in 2012.

	Drug resistant factors					
	IMP+ AAC(6')-Iae		IMP+ AAC(6')-Ib		Negative	
	MIC50 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC90 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC50 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC90 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC50 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC90 ($\mu\text{g/ml}$)
Antibiotics						
Cephalosporin						
CAZ	>128	>128	>128	>128	8	64
CEPM	>128	>128	>128	>128	16	64
Carbapenem						
MEPM	>128	>128	128	>128	16	64
PAPM	>128	>128	>128	>128	32	128
DPRM	>64	>64	>64	>64	8	32
IPM	128	>128	128	>128	16	32
Fluorquinolone						
CPFX	64	>128	32	128	32	64
LVFX	64	>128	64	128	64	128
Aminoglycoside						
AMK	128	128	32	64	32	64
ABK	8	32	16	64	16	64

Our study found that, of MDR *P. aeruginosa* isolates in Japan, IMP and AAC(6')-Iae co-producers increased from 2011 to 2012 and showed higher MICs of cephalosporins and carbapenems than other groups. These producers also showed higher MIC of AMK, not ABK. These results were supported by a previous report describing that *Escherichia coli* DH5 α expressing AAC(6')-Iae was resistant to AMK but not to gentamicin and ABK.

We recently isolated MDR *P. aeruginosa* strains producing the novel aminoglycoside enzymes, AAC(6')-Iaf and AAC(6')-Iaj. Thin-layer chromatographic assay demonstrated that these enzymes effectively hydrolyzed AMK more effectively. It is necessary to carefully monitor MDR *P. aeruginosa* isolates producing IMP-type metallo- β -lactamases, including novel IMP variants. These variants have been detected in MDR *P. aeruginosa* isolates, with one, IMP-43, conferring greater resistance to doripenem and meropenem but not to imipenem. Use of these immunochromatographic assays has revealed various aspects of MDR *P. aeruginosa* prevalence and provided epidemiological information about drug resistance factors associated with MDR *P. aeruginosa*. These immunochromatographic assays are simple methods that can rapidly detect antibiotic-resistance factors and are a useful alternative to PCR analysis for nationwide surveillance.

Using this rapid detection kit, we have initiated a feasibility study to detect severe blood infection of bacteria producing IMP, AAC(6')-Iae or AAC(6')-Ib. Until June 1st 2015, 30 of blood culture samples, which were positive for Gram-negative bacteria, were tested on the kits and found that one sample was positive with the kit. We will continue to collect the cases until the number is sufficient for statistical analysis.

イムノクロマト法による薬剤耐性因子の検出

特徴

- ◆イムノクロマト法を利用し薬剤耐性因子を検出
- ◆寒天平板培地で分離培養された緑膿菌コロニー等を検体として使用
- ◆検出項目は2種類の薬剤耐性因子*1

①アミノグリコシド薬剤耐性因子 ▶ AAC(6)-Iae

②β-ラクタム薬剤耐性因子 ▶ IMP型メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP型MBL)*2

- ◆一度の操作で薬剤耐性因子を同時、かつ個別に判定可能
- ◆操作は簡単・簡便 - 特別な手技や機器は不要
- ◆判定は15分

*1 これら以外の薬剤耐性因子は検出しません。

*2 IMP型MBLに関しては、IMP-1、IMP-2を始めとする、IMPの全ての重型に反応します。

操作方法

1 検体の採取



2 菌体の懸濁



3 テストプレートへ3滴



判定結果

ラインの有無にて薬剤耐性因子を検出可能

AAC(6)-Iae/IMP型MBL両陽性



AAC(6)-Iae判定ライン ↑ IMP型MBL判定ライン

陰性



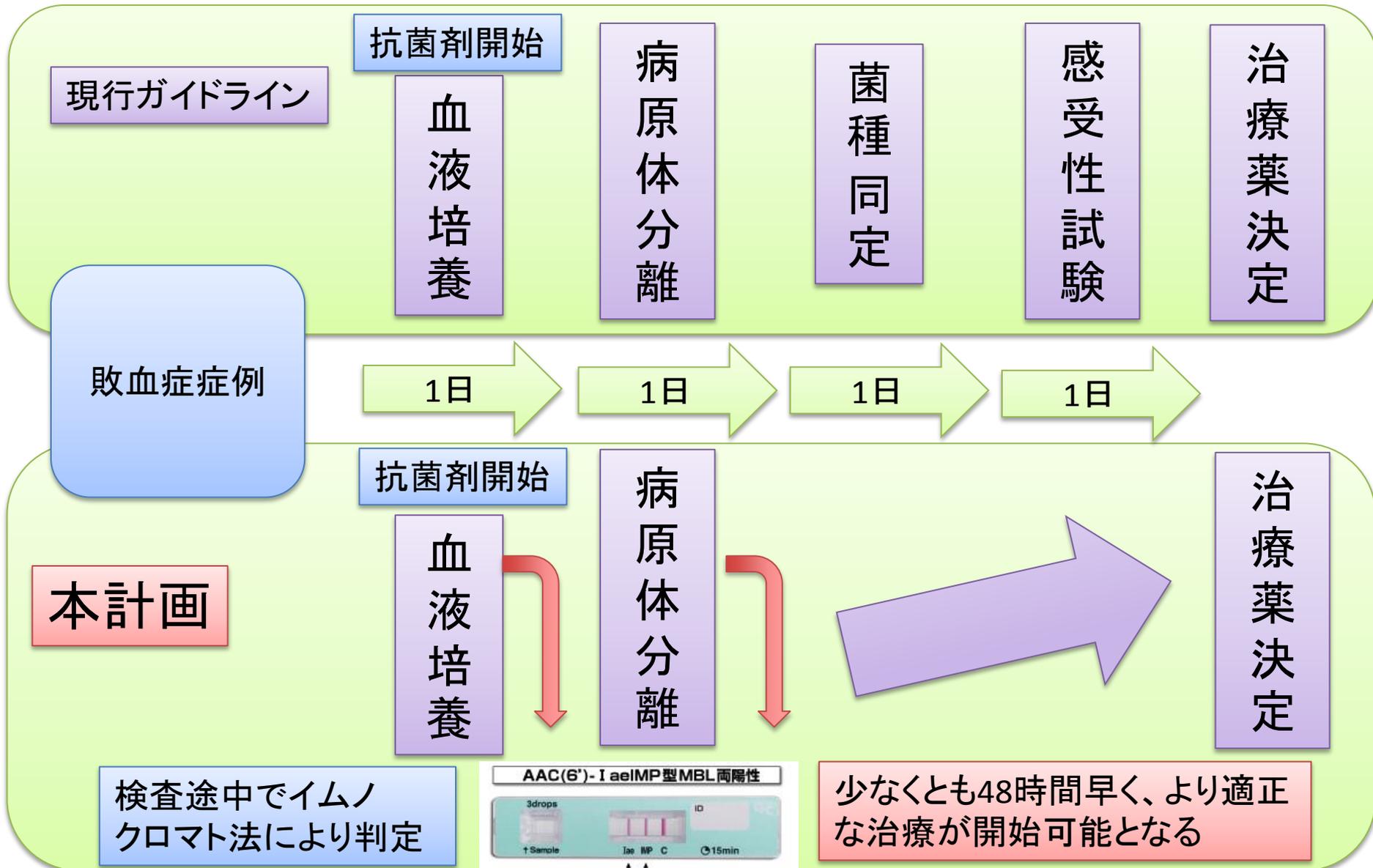
AAC(6)-Iae判定ライン ↑ IMP型MBL判定ライン

臨床株測定例

臨床株	アミノグリコシド薬剤耐性因子		β-ラクタム薬剤耐性因子		
	PCR法	本品	PCR法	本品	SMA法
	アミノグリコシド薬剤耐性遺伝子	AAC(6)-Iae	β-ラクタム薬剤耐性遺伝子	IMP型MBL	MBL産生
1	aac(6)-Iae	+	blaIMP-1	+	+
2	aac(6)-Iae	+	blaIMP-6	+	+
3	aac(6)-Iae	+	blaIMP-10	+	+
4	aac(6)-Iae	+	blaIMP-1	+	-
5	aac(6)-Iae	+	blaIMP-6	+	-
6	aac(6)-Iae	+	blaIMP-10	+	-
7	aac(6)-Iae	+	-	-	-
8	aac(6)-Ib	-	blaIMP-1	+	+
9	aac(6)-Ib	-	blaIMP-7	+	+
10	aacA4	-	blaIMP-1	+	+
11	-	-	blaIMP-1	+	+
12	-	-	blaIMP-7	+	+
13	aac(6)-Ib	-	blaIMP-7	+	-
14	aac(6)-3I	-	blaIMP-1	+	-
15	-	-	blaIMP-1	+	-
16	-	-	blaIMP-11	+	-
17	aac(6)-Ib	-	-	-	-
18	aac(6)-II(aacA7)	-	-	-	-
19	aac(6)-3I(S90E)	-	-	-	-
20	aacA1	-	-	-	-
21	aac(6)-3I	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-

- 病原菌のコロニー1個で判定可能
- わずか15分で判定
- PCR法などの既存法による判定結果との良好な一致性

現行敗血症治療と本計画の比較



Dissemination in Japan of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae/AAC(6')-Ib

Masayoshi Tojo^{a,b}, Tatsuya Tada^a, Masahiro Shimojima^d, Masashi Tanaka^c, Kenji Narahara^c, Tohru Miyoshi-Akiyama^a, Teruo Kirikae^{a,*}, Norio Ohmagari^b

^aDepartment of Infectious Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Toyama 1-21-1, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan

^bDisease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan

^cMizuho Medy Co., Ltd. R&D, Tosu, Saga, Japan

^dBML Inc., Kawagoe, Saitama, Japan

The spread throughout Japan of antibiotic-resistance factors in multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolates was investigated epidemiologically, using immunochromatographic assays specific for IMP-type metallo- β -lactamases (IMPs) and aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase [AAC(6')]-Iae and -Ib. Three hundred MDR *P. aeruginosa* isolates were obtained during each of two years, 2011 and 2012, from 190 hospitals in 39 prefectures in Japan. The percentage of *P. aeruginosa* isolates producing IMPs, AAC(6')-Iae or AAC(6')-Ib increased significantly from 170/300 (56.7%) in 2011 to 230/300 (76.7%) in 2012, with 134/170 (78.8%) in 2011 and 179/230 (77.8%) in 2012 producing both IMP and either AAC(6')-Iae or AAC(6')-Ib. The MICs of antibiotics, including cephalosporins and carbapenems, were markedly higher for isolates that did than did not produce these resistance factors. These results indicated that MDR *P. aeruginosa* producing IMPs, AAC(6')-Iae or AAC(6')-Ib have spread throughout Japan and that these antibiotic-resistance factors are useful markers for monitoring MDR *P. aeruginosa* in Japan.

Table 1

Regions and sample origins where MDR *P. aeruginosa* strains were obtained in 2011 and 2012.

A						
Year	Hokkaido/ Tohoku	Kanto/ Koshinetsu	Tokai/ Hokuriku/Kinki	Chugoku/ Shikoku	Kyushu/ Okinawa	Total
2011	53 (17.7%)	136 (45.3%)	71 (23.7%)	17 (5.7%)	23 (7.7%)	300
2012	40 (13.3%)	162 (54%)	67 (22.3%)	19 (6.3%)	19 (6.3%)	300
B						
Year	Respiratory tract	Urinary tract	Others	Total		
2011	134 (44.7%)	148 (49.3%)	18 (6%)	300		
2012	124 (41.3%)	164 (54.7%)	12 (4%)	300		

Table 2

Drug resistance factors in MDR *P. aeruginosa* isolates in Japan.

Drug resistant factors							
Year	IMP+ AAC(6')-Iae	IMP+ AAC(6')-Ib	IMP	AAC(6')-Iae	AAC(6')-Ib	Negative	Total
2011	86 (28.7%)	48 (16%)	5 (1.6%)	2 (0.6%)	29 (9.7%)	130 (43.3%)	300
2012	125 (41.7%)	54 (18%)	11 (3.6%)	10 (3.3%)	30 (10%)	70 (23.3%)	300

Three hundred isolates were analyzed in each of two years, 2011 and 2012. Analysis showed that 130 isolates (43.3%) obtained in 2011 and 70 isolates (23.3%) in 2012 were negative for all the three factors, while 170 isolates (56.7%) and 230 isolates (76.7%), respectively, harbored at least one of the three factors.

グラム陰性菌菌血症例におけるIMP/Iae・Ib薬剤耐性因子検出キットの有用性の検討



入院後72時間以上経過した患者の血液培養でグラム陰性菌が陽性

イムノクロマト



クイック チェイサーIMP/Iae・Ib

感受性検査（従来法）

PCR

Primary Outcome
PCRとの比較
(一致率)

Secondary Outcome
感受性検査との比較
(一致率)

IMP陽性との一致：

腸内細菌科

- ・ 第3世代(CAZ・CTRX): R
- ・ MEPM: IまたはR

緑膿菌・アシネトバクター

- ・ 上記基準にCFPM: R を追加

1ab/1e陽性との一致：

- ・ AMK: IまたはR

課題番号 : 25指206

研究課題名 : 重症細菌感染症の高度抗菌剤療法のための迅速薬剤耐性因子検出法の開発

主任研究者名 : 秋山 徹

分担研究者名 : 秋山 徹

キーワード : 薬剤耐性、迅速診断

研究成果 :

研究目的：本研究では、敗血症起因菌の薬剤耐性を従来法よりも大幅に短期間で判定するための迅速検査法を開発する。すでに筆者等はアミノグリコシド及び IMP 型メタロβラクタマーゼ薬剤耐性因子を 15 分で検出できるキットを開発している。これらのキットではカバーされない重要薬剤耐性因子が存在するため、それらの薬剤耐性因子産生の有無を判定可能な迅速検査キットを、抗原抗体反応などを利用して構築する。また並行実施される先述キットの敗血症における有用性を検討する臨床研究において、敗血症起因菌を研究参加医療施設から収集し、遺伝子検査法により薬剤耐性因子の有無を検査して、キット判定の結果と比較を行う。

必要性：敗血症の治療では、起因菌の迅速同定は適切な抗菌薬治療を開始するまでの時間を短縮し、患者死亡率の低下や入院日数の短縮につながる事が報告されている。また、血液培養の結果に基づく抗菌薬の変更は経験則的な治療を継続するよりも効果的であり、さらに、適切な抗菌薬に変更できれば、最初から適切な治療を施した場合と比較して患者の死亡率に大きな違いは生じないことも報告されている。そのため検体提出から感受性試験結果取得までの時間を短縮する迅速診断検査法の開発が臨床上極めて重要である。

期待される成果：敗血症の治療では起因菌に有効な抗生物質を投与することが第一であり、そのためには薬剤耐性因子などの迅速かつ確実な敗血症の診断が必須である。現時点における一般的な敗血症の診断法としては、培地に患者から採取した血液を混合し、一定時間培養して菌の発育を確認する血液培養法が行われている。しかし、血液培養で得られる結果は血中の菌の有無（陽性または陰性）のみであり、起因菌の同定には追加処理が必要である。追加処理として、一般的には、血液培養で陽性となった検体を種々の培地に移植して同定培養を行う方法がとられる。このような一連の操作に要する総時間は、多くの施設で最短でも 3～4 日（検体採取から菌の選択的分離：1～2 日、増菌：1 日、同定操作：1 日以上）である。これは、最適な治療法を選択するのに 3～4 日かかることを意味する。敗血症治療では、迅速

かつ確実な診断に基づき、最適な抗菌薬の投与を一刻も早く開始する必要があるにもかかわらず、実態としては、一般的な敗血症の検査診断方法では必ずしも十分に対応できていない。本研究で有効性評価を行うイムノクロマト法では、血液培養が陽性となった時点、もしくは分離培養から標的薬剤耐性因子産生の有無を15分で判定可能である。そのため起因菌に有効な薬剤を通常検査よりも96〜72時間速く選択できる可能性を提供し、患者予後の向上、具体的には救命率向上や入院期間短縮といった効果が期待できる。すでに構築済みのアミノグリコシド薬剤耐性因子とIMP型メタロβラクタマーゼ薬剤耐性遺伝子に加え、臨床上問題となる他の薬剤耐性因子の迅速検査法が構築されれば、それらの検出により死亡率の高い感染症である敗血症の予後は大きく改善されると期待される。

本研究では、2011年から2012年の間に日本の39都道府県、190病院から分離された緑膿菌を対象に、本キットによる解析を行った。IMP、AAC(6′)-Iaeもしくは-Ibを有する緑膿菌の割合は、2011年の56.7% (170/300) から2012年の78.8% (230/300)まで増加しており、このうちIMPとAAC(6′)-IaeもしくはIMPとAAC(6′)-Ibを同時に産生する株の割合は、2011年の78.8% (134/17) で2012年には77.8% (179/230)であった。またこれらの耐性機構を有する株のβラクタム系薬剤に対するMICは、耐性機構を有さない株と比較し目立って高かった。これらの結果は、IMP、AAC(6′)-Iaeもしくは-Ibを産生する緑膿菌が日本全国に広がっていることを示し、これらの耐性因子が日本における多剤耐性緑膿菌をモニタリングするための重要なマーカーであることが示された。βラクタム系薬剤、アミノグリコシドおよびフルオロキノロンの3系統の薬剤に耐性の多剤耐性緑膿菌が出現し、日本では大きな問題となっている。特に多剤耐性(MDR)株による緑膿菌感染症の院内集団発生は日本始め多くの国で報告されている。日本で頻回に分離される多剤耐性緑膿菌は、高頻度にIMP型メタロβ-ラクタマーゼおよび/またはアミノグリコシド6′-Nアセチルトランスフェラーゼ[AAC(6′)]-Iae and -Ibを産生している。これらの耐性機構を有する緑膿菌を検出するため、IMP型メタロβ-ラクタマーゼとアミノグリコシド6′-Nアセチルトランスフェラーゼ[AAC(6′)]-Iae and -Ibの検出のための免疫クロマトグラフィアッセイキットが開発された。これらの免疫クロマトグラフィアッセイの結果はPCR法の結果と完全に一致することが明らかとなった。

課題番号 : 25指206

研究課題名 : 迅速薬剤耐性因子検出法を用いた重症細菌感染症の高度抗菌剤療法による先進医療

主任研究者名 : 秋山 徹

分担研究者名 : 大曲 貴夫

キーワード : AAC(6')-Iae, AAC(6')-Ib, IMP, メタロβ-ラクタマーゼ、イムノクロマト法

研究成果 :

1. Dissemination in Japan of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates producing IMP-type metallo-β-lactamases and AAC (6') -Iae/AAC (6') -Ib

Masayoshi Tojo, Tatsuya Tada, Masahiro Shimojima, Masashi Tanaka, Kenji Narahara, Tohru Miyoshi-Akiyama, Teruo Kirikae, Norio Ohmagari

βラクタム系薬剤、アミノグリコシドおよびフルオロキノロンの3系統の薬剤に耐性の多剤耐性緑膿菌が出現し、日本では大きな問題となっている。特に多剤耐性(MDR)株による緑膿菌感染症の院内集団発生は日本始め多くの国で報告されている。日本で頻回に分離される多剤耐性緑膿菌は、高頻度にIMP型メタロβ-ラクタマーゼおよび/またはアミノグリコシド60-Nアセチルトランスフェラーゼ[AAC(6')]-Iae and -Ibを生成している。これらの耐性機構を有する緑膿菌を検出するため、IMP型メタロβ-ラクタマーゼとアミノグリコシド60-Nアセチルトランスフェラーゼ[AAC(6')]-Iae and -Ibの検出のための免疫クロマトグラフィアッセイキットが開発された。これらの免疫クロマトグラフィアッセイの結果はPCR方の結果と完全に一致することが示された。我々はこのキットを用いて2011年から2012年の間に日本の39都道府県、190病院から分離された緑膿菌を対象に、本キットによる解析を行った。

IMP、AAC(6')-Iaeもしくは-Ibを有する緑膿菌の割合は、2011年の56.7%(170/300)から2012年の78.8%(230/300)まで増加しており、このうちIMPとAAC(6')-IaeもしくはIMPとAAC(6')-Ibを同時に賛成する株の割合は、2011年の78.8%(134/17)で2012年には77.8%(179/230)であった。またこれらの耐性機構を有する株のβラクタム系薬剤に対するMICは、耐性機構を有さない株と比較し目立って高かった。これらの結果は、IMP、AAC(6')-Iaeもしくは-Ibを産生する緑膿菌が日本全国に広がっていることを示し、これらの耐性因子が日本における多剤耐性緑膿菌をモニタリングするための重要なマーカーであることが示された。

2. グラム陰性菌菌血症例におけるIMP/Iae・Ib薬剤耐性因子検出キットの有用性の検討

【背景】グラム陰性桿菌菌血症は重篤で死亡率も高い病態である。この診療において、現在医療機関の細菌検査室で行われている一般的な検査方法では、血液培養提出から菌名同定・感受性試験終了まで72-96時間程度時間がかかってしまう。これは最適な治療の選択には72-96時間かかることを意味する。グラム陰性桿菌敗血症患者の予後改善のためには、最適な抗菌薬の速やかな

投与が必要不可欠である。よって検体提出から感受性試験結果取得までの時間を如何に短縮するかが、臨床上極めて重要である。

一方で近年、グラム陰性桿菌の多剤耐性化が社会問題となっている。カルバペネム系抗菌薬の耐性遺伝子である blaIMP 遺伝子やアミノグリコシド系抗菌薬の耐性遺伝子である aac(6')-Iae 遺伝子/aac(6')-Ib 遺伝子もその一つである。これらの耐性遺伝子を持つグラム陰性桿菌による菌血症に対し早期から最適な抗菌薬を選択することは極めて困難である。IMP/1ae・1b 遺伝子検出キットは細菌のコロニーを用いて IMP 遺伝子と 1ae 遺伝子/1b 遺伝子を検出するキットであるが、本キットが陽性となった血液培養検体を用いても高い有効性を持つことが示されれば、多剤耐性グラム陰性桿菌菌血症に対する早期からの最適な抗菌薬の投与が可能となり得る。

【目的】一般臨床で得られた血液培養陽性検体から得られた菌を用いて、グラム陰性桿菌菌血症例におけるイムノクロマト法を利用した IMP/1ae・1b 遺伝子検出キット「クイック チェイサーIMP/Iae・Ib」（以下「本キット」とする）の従来の検査方法との一致性について検討する。

【対象・方法】入院後 72 時間以上経過し、血流感染症が疑われる入院患者から採取された血液検体を、従来法に従って血液培養検査を行う。血液培養自動分析装置にて陽性と判定された好気性血液培養ボトル検体に対し、従来法に従ってグラム染色を行う。グラム染色にて陰性菌と判断された検体を従来法に従って分離培養し、菌種同定と薬剤感受性試験を行う。また、グラム染色で陰性菌と判断された検体は従来法による分離培養操作と並行して本キットによる判定も行う。本キットで IMP, 1ae, 1b のいずれかが陽性と判定された血液検体から同定された菌株または従来法において同定された細菌の感受性検査結果がカルバペネム系抗菌薬またはアミノグリコシド系抗菌薬に耐性と判定された菌株は、後日 PCR(polymerase chain reaction:ポリメラーゼ連鎖反応遺伝子増幅法)を用いて blaIMP 遺伝子、aac(6')-Iae 遺伝子、aac(6')-Ib 遺伝子を検査し本キットとの一致性を検討する。また、本キットですべて陰性と判定され、従来法の感受性検査結果でもカルバペネム系およびアミノグリコシド系に感受性と判定された菌株についても PCR を用いて遺伝子検査を行い本キットとの一致性を検討する。薬剤耐性遺伝子の同定が不一致の場合、当該耐性遺伝子の遺伝子配列を決定し、遺伝子亜型を決定し、不一致の原因を明らかにする。研究期間は 2014 年 9 月 1 日から 2015 年 8 月 31 日までとする。

【結果】2014 年 11 月 28 日より研究を開始。2015 年 6 月 15 日時点で 46 症例が登録。1 検体でイムノクロマトグラフィー法において IMP 陽性であった (PCR は未施行)。

本研究は 2015 年 10 月 31 日まで継続予定である。

Dissemination in Japan of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae/AAC(6')-Ib

Masayoshi Tojo^{a,b}, Tatsuya Tada^a, Masahiro Shimojima^d, Masashi Tanaka^c, Kenji Narahara^c, Tohru Miyoshi-Akiyama^a, Teruo Kirikae^{a,*}, Norio Ohmagari^b

^aDepartment of Infectious Diseases, Research Institute, National Center for Global Health and Medicine, Toyama 1-21-1, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan

^bDisease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan

^cMizuho Medy Co., Ltd. R&D, Tosu, Saga, Japan

^dBML Inc., Kawagoe, Saitama, Japan

The spread throughout Japan of antibiotic-resistance factors in multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolates was investigated epidemiologically, using immunochromatographic assays specific for IMP-type metallo- β -lactamases (IMPs) and aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase [AAC(6')]-Iae and -Ib. Three hundred MDR *P. aeruginosa* isolates were obtained during each of two years, 2011 and 2012, from 190 hospitals in 39 prefectures in Japan. The percentage of *P. aeruginosa* isolates producing IMPs, AAC(6')-Iae or AAC(6')-Ib increased significantly from 170/300 (56.7%) in 2011 to 230/300 (76.7%) in 2012, with 134/170 (78.8%) in 2011 and 179/230 (77.8%) in 2012 producing both IMP and either AAC(6')-Iae or AAC(6')-Ib. The MICs of antibiotics, including cephalosporins and carbapenems, were markedly higher for isolates that did than did not produce these resistance factors. These results indicated that MDR *P. aeruginosa* producing IMPs, AAC(6')-Iae or AAC(6')-Ib have spread throughout Japan and that these antibiotic-resistance factors are useful markers for monitoring MDR *P. aeruginosa* in Japan.

Table 1

Regions and sample origins where MDR *P. aeruginosa* strains were obtained in 2011 and 2012.

A						
Year	Hokkaido/ Tohoku	Kanto/ Koshinetsu	Tokai/ Hokuriku/Kinki	Chugoku/ Shikoku	Kyushu/ Okinawa	Total
2011	53 (17.7%)	136 (45.3%)	71 (23.7%)	17 (5.7%)	23 (7.7%)	300
2012	40 (13.3%)	162 (54%)	67 (22.3%)	19 (6.3%)	19 (6.3%)	300
B						
Year	Respiratory tract	Urinary tract	Others	Total		
2011	134 (44.7%)	148 (49.3%)	18 (6%)	300		
2012	124 (41.3%)	164 (54.7%)	12 (4%)	300		

Table 2

Drug resistance factors in MDR *P. aeruginosa* isolates in Japan.

Drug resistant factors							
Year	IMP+ AAC(6')-Iae	IMP+ AAC(6')-Ib	IMP	AAC(6')-Iae	AAC(6')-Ib	Negative	Total
2011	86 (28.7%)	48 (16%)	5 (1.6%)	2 (0.6%)	29 (9.7%)	130 (43.3%)	300
2012	125 (41.7%)	54 (18%)	11 (3.6%)	10 (3.3%)	30 (10%)	70 (23.3%)	300

Three hundred isolates were analyzed in each of two years, 2011 and 2012. Analysis showed that 130 isolates (43.3%) obtained in 2011 and 70 isolates (23.3%) in 2012 were negative for all the three factors, while 170 isolates (56.7%) and 230 isolates (76.7%), respectively, harbored at least one of the three factors.

グラム陰性菌菌血症例におけるIMP/Iae・Ib薬剤耐性因子検出キットの有用性の検討



入院後72時間以上経過した患者の血液培養でグラム陰性菌が陽性

イムノクロマト



クイック チェイサーIMP/Iae・Ib

感受性検査（従来法）

PCR

Primary Outcome
PCRとの比較
(一致率)

Secondary Outcome
感受性検査との比較
(一致率)

IMP陽性との一致：

腸内細菌科

・ 第3世代(CAZ・CTRX): R

・ MEPM: I または R

緑膿菌・アシネトバクター

・ 上記基準にCFPM: R を追加

1ab/1e陽性との一致：

・ AMK: I または R

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：25指206

研究課題名：迅速薬剤耐性因子検出法を用いた重症細菌感染症の高度抗菌剤療法による先進医療

主任研究者名：秋山 徹

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Dissemination in Japan of multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates producing IMP-type metallo- β -lactamases and AAC(6')-Iae/AAC(6')-Ib.	Tojo M, Tada T, Shimojima M, Tanaka M, Narahara K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, Ohmagari N.	J Infect Chemother.	S1341-321X(14)00180-9.	2014

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
該当無し				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当無し				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日 (申請日)	出願国
該当無し				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。