

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04795

研究課題名(和文)救命センターにおける多剤耐性アシネトバクターbaumanni 感染経路の解明

研究課題名(英文)An analysis for the outbreak of multiple drug resistance Acinetobacter Baumannii in the critical care center

研究代表者

井上 貴昭 (INOUE, YOSHIAKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60379196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,700,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性アシネトバクター(MDRA)は、近年救命センターを中心に死者を含むアウトブレイクが相次ぎ、院内感染上の大きな問題である。我々は、過去5年間に分離培養された63人の患者のA. Baumanniiの遺伝子解析を実施し、抗菌薬耐性との関係を検討した。その結果、遺伝子配列が特徴的に抗菌薬耐性と相関することが明らかとなり、アシネトバクター保菌者について速やかに遺伝子解析を実施し、遺伝子パターンに基づいて効率的に隔離することにより、これまで8年間にわたり継続していたMDRAのアウトブレイクは終息でき、PCR遺伝子解析をベースとする隔離対策の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：Multi Drug Resistant Acinetobacter Baumannii (MDRA) was one of the major problems for nosocomial infection that was outbreaked including the dead in the some critical care center recently. We analyzed 63 patients with positive Acinetobacter Baumannii specimen and compared the resistance of antibiotics. Gene patterns of MDRA were clearly correlated to the resistance of antibiotics, so we ensured the isolation protocol with gene pattern for the patients with Acinetobacter Baumannii colonization. We succeeded the end of outbreak for MDRA based on PCR oriented isolation for Acinetobacter Baumannii.

研究分野：救急医学

キーワード：Acinetobacter Baumannii 院内感染 遺伝子解析 効率的隔離策

1. 研究開始当初の背景

近年救命センターを要する大学病院を中心に、死者を含む多剤耐性アシネトバクター (MDRA) のアウトブレイク事例の報告が相次いでいる。いずれも地域の中核をなす救命センターが感染の蔓延に強く関与していたため、救急患者の受け入れ制限を余儀なくされ、地域の救急医療体制に大幅な乱れを生じさせた大問題となった。日本感染症学会はこれを重要視し、2010年10月にはMDRA感染症に関する提言を出し、MDRAに対するサーベイランスの必要性、国内未認可の抗菌薬の早期承認、治療薬開発の促進を求めている。しかし、未だ決定的な対応策はなく、現状把握さえ困難な状況である。我々も2012年に55名、2014年に32名のMDRA保菌患者伝播をきたした院内感染を経験した。一度院内発生したMDRAは、その環境棲息能力の高さから、その撲滅は困難であり、当院でも遺伝子解析の結果、すべてのMDRAが5年以上にわたり、同じ遺伝子型で継代培養されていた事実が明らかとなった。一方MDRAに関しては、病院内侵入経路や、伝播経路、更には消退過程など未だ不明な点は極めて多い。当施設を含め、これまで本邦でMDRAアウトブレイクを生じた施設は救命センターを要する地域の中核病院がほとんどであるが、その実情・実態、対策方法は公開しづらい情報でもあり、十分に明らかにはされていない。加えてMDRAが何故救命センターなど急性期病棟に長く棲息し、どこに潜み、どの時期に消退していくのか、院内環境での経過も不明瞭である。そのために、生物学的に、科学的に有効かつ効率的な対策がいまだ打ち立てられていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、現在国内の救命センターにおいていまだ定まらないMDRAに対して、科学的根拠に基づき、確実に効率的に感染制御可能な対策を打ち立てることを最終目的とし、下記のプロジェクトを目的とした。

- 遺伝子解析を用いて、アシネトバクター属サブタイプを速やかに同定し、隔離を要するAB保菌患者を効率的に早期に診断し、蔓延未然に防ぐシステムを確立すること。
- アシネトバクター保菌者に対して、遺伝子型を用いて隔離を実施することにより、アウトブレイクが抑制できるかどうかを確認すること。

3. 研究の方法

(1) アシネトバクター属の選択的増菌法の確立

現行の分離培養では、グラム陰性桿菌が多数検出される検体やグラム陰性桿菌が生息する水場環境検査を実施するのは困難であつ

た。我々はCHROMagar™ Acinetobacter 培地 (AS培地) を使用したスクリーニング検査の有用性について検討し、良好な結果を得た。これに加えて、カルバペネムが低感受性化した特定のAB保菌者の効率的な検出には、AS培地の改良もしくは液体培地を使用した選択的増菌法の開発を要する。このAS培地について、溶媒を調整し、液体培地を改良した上で、特定のABを効率的に検出できる培地及び選択的増菌法をまず確立する。

(2) 救命センターにおける Acinetobacter Baumannii 検出率の評価

救命センター入室時に、検出頻度が高い喀痰を検体として active surveillance を実施する。保菌患者については、当院あるいは他院の入院歴を明らかにし、喀痰以外に咽頭、鼻腔、尿、喀痰培養を実施し、保菌好発部位を明らかにする。また、上記(2)で実施した病院前環境との関連性を明らかにする。併せて救命センター退室時スクリーニング検査を実施し、喀痰、尿、便に関して入室時 active surveillance 検査と比較して水平伝播の実態を明らかにする。

(3) アシネトバクター属の遺伝子分析による同定法の確立

上記研究(1)(2)において、各々分離培養したABを検体として、AB complex に属する菌種よりABを正確に識別するため、A. Baumannii 属の識別遺伝子である blaOXA-51-like の有無をポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) 法によって識別した。PCRはLightCycler 96 (Roche) を用いた。OXA-51(+)のA. Baumannii 保菌患者については、更にアシネトバクター属のカルバペネム耐性遺伝子である、blaOXA-23、24、58、ISAba1、IMP、VIMに特異的なプライマーを作製し、PCR based ORF typing (POT) 法により、カルバペネム耐性遺伝子保有状況を実施した。このPCR、POT法にてA. Baumannii の遺伝子型を明らかにし、抗菌薬感受性との関連性を評価した。

(4) アシネトバクター属の遺伝子分析による隔離策の確立と有効性の確認

上記(3)によって、アシネトバクターが検出された患者について、その遺伝子型から隔離対策のポリシーを確立し、実施した。これによってA. Baumannii の検出率が低下するかどうかを調査した。

上記(1)-(4)の研究法の概略を下記に示す



図1. 研究方法概略

4. 研究成果

(1) アシネトバクテリ属選択培地の導入

通常の BTB 乳糖加寒天培地では、救命センターで高頻度に検出される緑膿菌やクレブシエラ、MRSA などのコロニーとアシネトバクテリ属を鑑別するのは困難である。当 CHROMoger acinetoacterOR(関東化学)を用いたところ、Acinetobacter 属は赤色に培養され、他のグラム陰性菌は青色に染色され(図 1)、アシネトバクテリ属が識別可能であり、選択培養が可能であった。本研究では、この以降の CHROMoger acinetoacterOR でまず培養を実施し、赤色の Acinetobacter 属が検出された場合、このコロニーを分離培養して、以降の遺伝子解析に用いることとした。

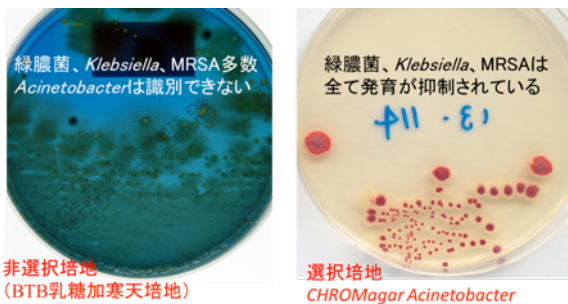


図 2. アシネト選択培地

(2) 当院救命センターにおける A. Baumannii の active surveillance と保菌率の検出

順天堂大学医学部附属浦安病院は千葉県南西部に位置する 160 万医療人口圏をカバーする 3 次救命救急センターであり、年間約 5000 台の救急車及び約 17000 人の Walk in 患者を収容する。2009 年より救命センターに入院する患者について鼻腔拭い検体で A. Baumannii の保菌率を Active Surveillance にて実施した。Active Surveillance による検出率は 2015 年 1.73% (対象患者 1500 名)、2016 年 1.44% (対象患者 1388 名)、2017 年 0.95% (対象患者 1481 名) であった。

(3) 当院における A. Baumannii の抗菌薬最小増殖抑制率 (MIC)

図 3 に当院における A. Baumannii の抗菌薬感受性を示す。図 3 の A, B, C に示すように抗菌薬感受性は、A 多剤耐性アシネトバクテリ、B カルバペネムのみ耐性、C. 全抗菌薬感受性、の 3 種に分けられた。

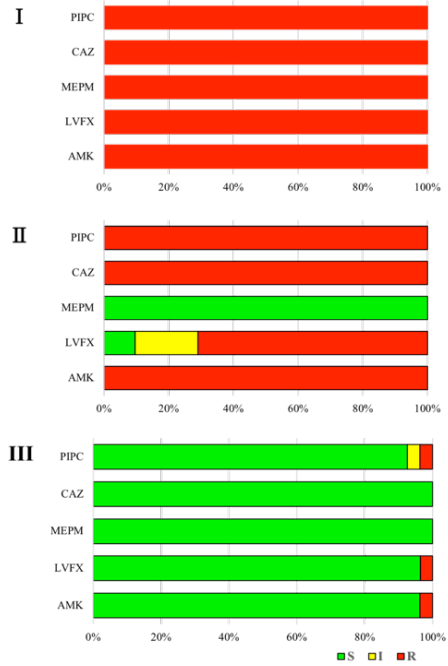


図 3. Acinetobacter Baumannii の抗菌薬感受性

順天堂大学医学部附属浦安病院では本研究期間中を含め、2011 年よりこれまでに選択培地で検出された Acinetobacter 属の検体数はのべ 594 件(患者数 63 名)であった。その内、上記感受性 I 型を示すものは 14 件、II 型を示すものは 150 件、III 型を示すものは 241 件であった。この陽性者 63 名の検体における PCR の結果を図 4 に示す。

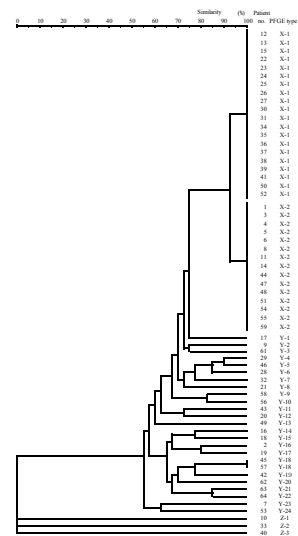


図 4. A. Baumannii 遺伝子解析結果

63 人の A. Baumannii 培養陽性患者のうち、6 名は OXA51 (+) / ISAbal (+) / IMP (+) であった。これらはいずれも抗菌薬感受性は、上記 I 型を示した。30 名は OXA51 (+) / ISAbal (+) であったが、それ以外の A. Baumannii 耐性遺伝子である blaOXA-23、24、58、IMP、VIM はいずれも検出されなかった。これらの抗菌薬感

受性は上記Ⅱ型であった。27名は、OXA51(+)であるが、ISAbal、blaOXA-23、24、58、IMP、VIMはいずれも検出されなかった。これらの抗菌薬耐性は上記Ⅲ型であった。これらは下記の表のようにまとめられた。

遺伝子型			抗菌薬耐性			患者数 (人)
OXA-	ISAbal	IMP	Carbapenem	Quinolone	Aminoglycosi	
51	I				de	
+	+	+	R	R	R	6
+	+	-	R (MIC ≥ 2)	R	R	30
+	-	-	S	S	S	27

表1. 抗菌薬耐性と A. Baumannii 遺伝子型

(4) 遺伝子型を用いた隔離法導入前後の A. Baumannii 検出数の推移

上記表1における遺伝子型と抗菌薬耐性をもとに、図4に示すように A. Baumannii 検出患者における隔離方針を定めた。2015年12月より本プロトコルを実施し、以降の A. Baumannii 検出状況を前向きに調査した。



図5に2012年1月から2017年12月までの当院全体における喀痰培養中の Acinetobacter 属の検出数と遺伝子型を示す。院内検出数はほとんどが救命センターで検出されていた。2015年より遺伝子型を用いた隔離法を実施以降、徐々に耐性型 A. Baumannii 新規検出数が減少していることがわかる。また、2016年以降、保菌者の再入院を除き、3剤耐性の MDRA は検出されていない

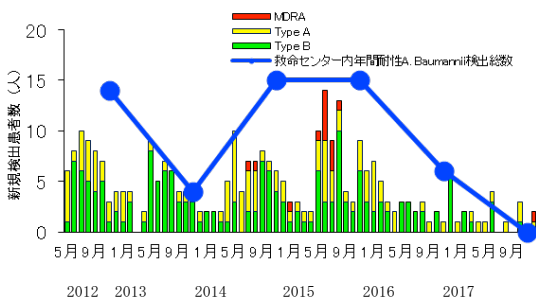


図5. A. Baumannii の検出数の推移

我々は、これまでに2回にわたる A. Baumannii のアウトブレイクを経験し、高リスク患者として、(1) 気管挿管・気管切開を有して人工呼吸管理を有する患者、(2) 広範囲熱傷患者や四肢解放創など、洗浄処置を有する患者、であること、また(3) A. Baumannii でも抗菌薬感受性が大きく異なること、などを認識していた。従って救命センターに入院する高リスク患者について、入院時に active surveillance によって保菌の有無を確認し、陽性者には抗菌薬感受性が確定に必要な5-7日間よりも前に、隔離の必要性を速やかに判断し、効率的隔離により、アウトブレイクが予防できると考えた。PCR 及び、PCR-ORF typing (POT)法は、4時間程度で遺伝子型を定量評価でき、救命センターにおいて迅速に隔離対策を実施するために、A. Baumannii 感染予防に有用である。今回、A. Baumannii の遺伝子解析を実施し、抗菌薬感受性との関係を明らかにし、効率的で科学的根拠に基づく隔離策確立することを目的に本研究を実施した。まず、A. Baumannii の培養には、Acinetobacter 属とその他のグラム陰性桿菌との鑑別が可能な、CHROMger acinetobacter 培地を用いた。これにより、救命センターに入院する高リスク患者に対して、active surveillance を実施して、速やかな Acinetobacter 属の分離培養が可能となった(図2)。選択分離培養された A. Baumannii について、まずは Acinetobacter 属の中でも高度の薬剤耐性を示す A. Baumannii を同定するために、OXA-51 を目標遺伝子として PCR を実施した。OXA 51 (+) 陽性株については、薬剤耐性があるかどうかの遺伝子タイピングを、blaOXA-23、24、58、IMP、VIM、ISAbal 遺伝子について実施した。その結果、表1に示すように3種類の遺伝子型が判明した。これらは、図3は、MIC ≥ 2ではあるが、比較的カルバペネム耐性は低いキノロン・アミドグリコシド2剤耐性を示した。また、OXA51(+)の27名は、抗菌薬耐性は認めなかった。以上の遺伝子型と抗菌薬耐性の関係として、OXA-51 保有株は、A. Baumannii を特定し、IMP 遺伝子の有無は、カルバペネム耐性発現を支配すると考えられた。また、ISAbal 遺伝子の有無は、耐性発現のプロモーター発現を支配すると考えられた。これらは下記の図6のようにまとめられる。

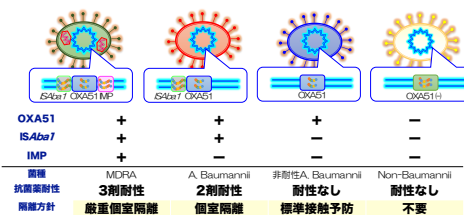


図6

従って、選択培地で A. Baumannii と同定されても、必ずしも隔離を要せず、隔離対策の

指針となり得る可能性が示唆され、図 4・6 に示すような隔離対策を確立した。2015 年 12 月より本方針による対策を導入し、合わせて手洗いオーデット強化、環境監査と清掃、職員への教育、などの対策を重点的に実施した。その結果、*A. Baumannii* の分離培養陽性率は経月的に減少傾向を示した。

2015 年 12 月より本方針による対策を導入し、合わせて手洗いオーデット強化、環境監査と清掃、職員への教育、などの対策を重点的に実施した。その結果、*A. Baumannii* の分離培養陽性率は経月的に減少傾向を示した。

一方で、PCR による遺伝子タイピングから明らかになった点として、同一遺伝子が継代培養されてきた可能性が示唆された。すなわち、*A. Baumannii* 自体は、環境下で長期生存し、そのまま水平感染を反復してきた可能性が浮き彫りとなった。従って、環境汚染が改善しないかぎり、本隔離策は意味をなさない。個人対策、環境対策に加えて、本研究で明らかした、リスクが高い救命センターにおける Active Surveillance と *A. Baumannii* 選択培養と遺伝子型解析を用いた効率的で科学的根拠に基づく隔離対策は、*A. Baumannii* のアウトブレイクを防ぐ重要な対策となり得る可能性がある。

<引用文献>

① CDC. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004, MMWR, 53, 2004, 1063-1066

② Brown S, Young HK, Amyes SG, Characterisation of OXA-51. A novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 11, 2005, 15-23

③ Illigins PG, Dammhayn C, Hackel M, et al, Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *J Antimicrobiol*, 48, 2010, 4051-4056

5. 主な発表論文等

(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 6 件)

①井上貴昭、敗血症性ショック、DIC の対応、泌尿器外科、査読無、30、2017、589-595

② Yujiro Matsuishi, Subrina Jesmin, Satoru Kawano, Sakuramoto Hideaki, Nobutake Shimojo, Chishimba Nathan Mowa, Shila Akhtar, Soheli Zaedi, Tanzila Khatun, Yoshiya Tsunoda, Takumi Kiwamoto, Nobuyuki Hizawa, Yoshiaki Inoue, Taro Mizutani. *Landiolol*

hydrochloride ameliorates acute lung injury in a rat model of early sepsis through the suppression of elevated levels of pulmonary endothelin-1, *Life Science*, 査読有, 166, 2016, 27-33

③Koichiro Sueyoshi, Yuka Sumi, Yoshiaki Inoue, Yoko Kuroda, Kumiko Ishii, Hitoshi Nakayama, Kazuhisa Iwabuchi, Yasutaka Kurishita, Hajime Shigemitsu, Itaru Hamachi and Hiroshi Tanaka, *Fluorescence imaging of ATP in neutrophils from patients with sepsis using organelle-localizable fluorescent chemosensors*. *Annals of Intensive Care*, 査読有, 64, 2016, 1-8

④井上貴昭、急性臓器障害のとらえ方 ベッドサイドにおけるアルゴリズム、救急医学、査読無、40、2016、866-875

⑤中沢武司、佐々木信一、井上貴昭、多剤耐性菌の検査と感染制御、臨床と微生物、査読無、42、2015、561-567

⑥中沢武司、佐々木信一、井上貴昭、多剤耐性菌(多剤耐性アシネトバクター:MDRA)対策、臨床と微生物、査読無、42、2015、602-608

[学会発表] (計 12 件)

①中村美子、中澤武司、村田健介、佐々木信一、耐性菌拡散防止のための継続的 ICT ラウンドの有用性. 第 33 回日本環境感染学会. 2018 年 2 月

②鈴木隆元、中澤武司、佐々木信一、急性期脳卒中患者のアシネトバクターバウマニ感染のリスク因子解析. 第 33 回日本環境感染学会. 2018 年 2 月

③中澤武司、佐々木信一、MALDI-TOF MS による *Acinetobacter* spp. 臨床分離株の解析. 第 66 回日本医学検査学会・学術集会. 2017 年 6 月

④鈴木隆元、中村美子、中澤武司、安田雅一、秋田美佳、戸田純司、成田久美、村田健介、新妻隆広、鈴木隆元、大日方薫、佐々木信一、当院での感染制御リンクドクター制度の試み. 第 32 回日本環境感染学会総会. 2017 年 2 月

⑤中村美子、中澤武司、安田雅一、秋田美佳、戸田純司、成田久美、村田健介、新妻隆広、鈴木隆元、大日方薫、佐々木信一、耐性菌拡散防止のための継続的 ICT ラウンドの有用性. 第 32 回日本環境感染学会総会. 2017 年 2 月

⑥村田健介、井上貴昭、角由佳、岡本健、秋田美佳、中村美子、海宝まゆ子、中沢武司、佐々木信一、田中裕. 遺伝子解析によるアシネトバクター属菌の菌種と耐性菌評価. 第 44 回日本集中治療医学会総会・学術集会. 2017 年 11 月

⑦井上貴昭. 熱傷初期治療のプラスアルファを考える. 第44回日本集中治療医学会総会・学術集会. 2017年11月

⑧井上貴昭. カテーテル関連性感染症. 第44回日本集中治療医学会総会・学術集会. 2017年11月

⑨ Yoshiaki Inoue. Novel biomarker to reflect oxidative stress for the patients with sepsis. The 8th Asian Conference of Emergency medicine. Nov, 2015

⑩海宝まゆ子、中沢武司、佐々木信一、井上貴昭、麻生恭代. 当院で分離された *Acinetobacter* sp. の疫学解析. 第27回日本臨床微生物学会総会・学術集会. 2016年1月

⑪戸田純司、佐々木信一、成田久美、室岡邦彦、秋田美佳、中村美子、中澤武司、西崎直人、井上貴昭、大日方薫、野島美知夫. 新生児患者におけるバンコマイシンの TDM に関する検討. 第31回日本環境感染学会総会・学術集会, 2016年2月

⑫中村良子、中澤武司、秋田美佳、井上貴昭、佐々木信一. 救急救命センターと集中治療におけるアシネトバクター対策に関する環境清掃の重要性. 第31回日本環境感染学会総会・学術集会, 2016年2月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 貴昭 (INOUE Yoshiaki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60379196

(2) 研究分担者

佐々木 信一 (SASAKI Shinichi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40281357

岡本 健 (OKAMOTO Ken)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40347076

田中 裕 (TANAKA Hiroshi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：90252676

(3) 研究協力者

中澤 武司 (NAKAZAWA Takeshi)