

意識に関する項目の考察

HIV感染者受け入れに関する意識の傾向

自院でHIV感染者を受け入れることで、他の患者が来なくなるとの懸念がある

歯科医師自身がHIV感染者の治療に対して否定的である。

肝炎患者に比べ、HIV患者の治療は受け入れる意思が低い。

意識に関する項目の考察

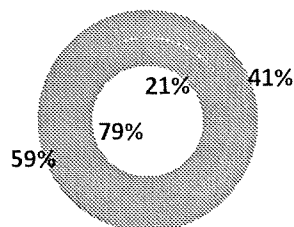
平成18年と平成20年のアンケートの間で自院でのHIV感染者受け入れに対する歯科医師の意識の変化は見られなかった。



医療法改正や、保険点数の改正が、歯科医師のHIV感染者受け入れへの意識改革には結びつかなかった。

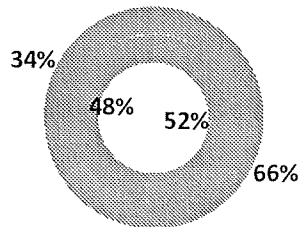
行動に関する項目①

感染対策マニュアルを
作成しているか



※ 作成している ※ 作成していない

感染対策の研修会に
参加したことはあるか

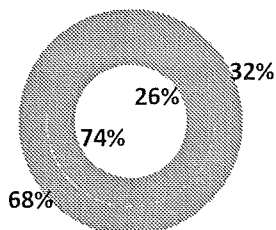


※ ある ※ ない

内円：平成18年度
外円：平成20年度

行動に関する項目②

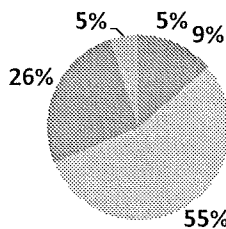
口腔外バキュームを
設置しているか



※ 設置している ※ 設置していない

内円：平成18年度
外円：平成20年度

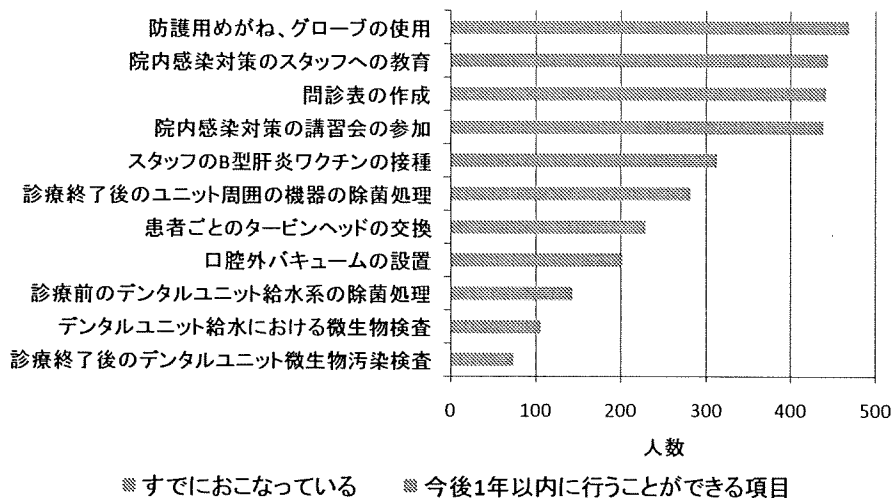
平成20年4月の保険点
数改定により口腔外
バキュームを設置したか



※ 新たに設置した
※ 設置を考えている
※ 未定
※ この加算以前から既に設置している
※ この要件を知らなかった

行動に関する項目③

今後1年以内に対策をとれる項目（複数回答）



行動に関する考察

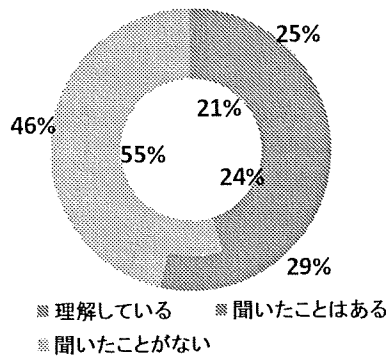
「感染マニュアルを作成」「感染対策の研修会に参加」は、平成18年と平成20年の間に明らかな改善傾向が示された。

コスト負担の少ない項目に関しては更なる改善が期待できる。院内感染対策の必要性の認識のために、研修会等の参加を促進することが大切である。

コスト負担がかかる項目について改善していくのは依然難しい。しかし、口腔外バキュームの設置率上昇には、平成20年度の保険点数改正の影響が考えられることから、点数改正による支援は有効である。

知識に関する項目①

スタンダードプリコーション
とは何か知っているか

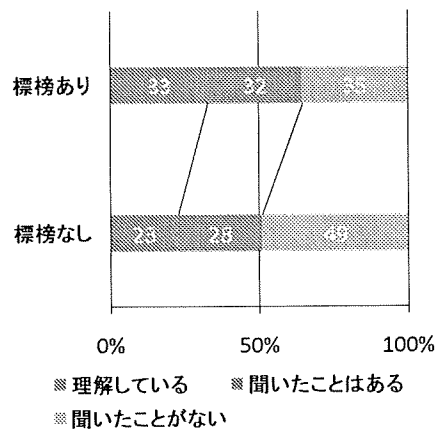


内円：平成18年度
外円：平成20年度

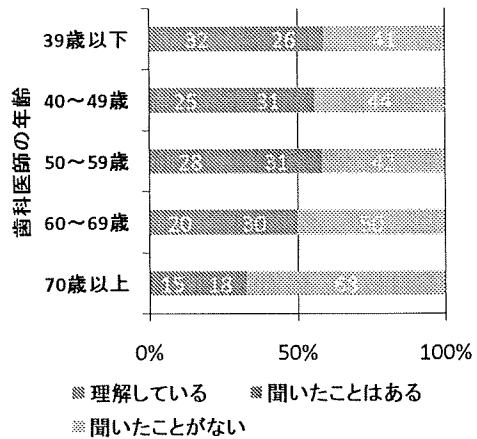
知識に関する項目②

スタンダードプリコーションを理解している割合

口腔外科標榜の有無別
(平成20年度)



年代別
(平成20年度)



知識に関する項目の考察

口腔外科を標榜している歯科医師に、スタンダードプリコーションの理解度が高かった。

口腔外科は臨床現場で感染症患者に接することが多く、院内感染予防の重要性をより理解している

全年代に、スタンダードプリコーションの理解が低い。70代以上になると、さらに理解度が低かった。

スタンダードプリコーションは96年以降の概念であるため、この教育をうける機会がなかった高齢者層の歯科医師で理解度が低かったのではないかと考えられました。

結 語

医療法改正後も、HIV感染者の歯科治療の受け入れに関しての歯科医師の意識に変化はみられず、否定的な意見が多かった。

感染予防対策のうちコスト負担が少ないものは実行されつつある。

スタンダードプリコーションを基本軸にした感染予防対策に関する啓蒙や、研修機会の提供が必要である。

さらなる院内感染予防対策の改善のために、コスト面を軽減する保険点数改正や、スタンダードプリコーションに基づいた医療が実行されているかを評価する機構などが存在してもよいのではないだろうか。

〈原著〉

メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィルム形成能および 分子疫学的解析

山本満寿美¹⁾・狩山 玲子²⁾・光畑 律子²⁾・公文 裕巳²⁾・千田 好子^{1,3)}

Biofilm-forming Capabilities and Molecular Epidemiological Analysis of Metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa

Masumi YAMAMOTO¹⁾, Reiko KARIYAMA²⁾, Ritsuko MITSUHATA²⁾, Hiromi KUMON²⁾ and Yoshiko SENDA^{1,3)}¹⁾Graduate School of Health Sciences, Okayama University²⁾Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences³⁾Presently Sanyo Gakuen University, Department of Nursing

(2008年8月18日 受付・2009年1月19日 受理)

要 旨

A 県 3 施設で 2001 年から 2006 年の 6 年間に入院患者より分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生緑膿菌 123 株のバイオフィルム形成能と薬剤耐性状況を検討し、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による分子疫学的解析を行った。材料別内訳は、尿 79 株、喀痰 10 株、便 10 株、膿 5 株、血液 2 株、その他 17 株であった。123 株中、106 株 (86.2%) がイミペネム (IPM)、シプロフロキサシン (CPFX)、アミカシン (AMK) の 3 剤に耐性を示す多剤耐性緑膿菌 (MDRP) であった。バイオフィルム高度形成群 ($OD_{570} \geq 1$) は 29 株 (23.6%)、中等度 ($1 > OD_{570} \geq 0.5$) 47 株 (38.2%)、低度 ($0.5 > OD_{570} \geq 0$) 47 株 (38.2%) であった。123 株のバイオフィルム形成能の平均 OD_{570} 値は 0.71 ± 0.04 (mean \pm SE) であり、比較対象として用いた MBL 非産生緑膿菌 122 株の 0.28 ± 0.04 よりも有意に高い形成能を示した。バイオフィルム高度・中等度形成群 76 株のうち、MDRP は 71 株 (93.4%) で、尿由来株は 57 株 (75.0%) であった。MBL 産生緑膿菌 123 株の PFGE 解析において同一株はなかったが、類似係数 85% の株を 12 組認めた。分離日は同日ないし 4 日から約 3 ヶ月の隔たりがあった。バイオフィルム形成能が高い菌株は環境中に長期に生息する可能性が高い。MBL 産生緑膿菌や MDRP の伝播・拡散防止のためには、徹底した標準予防策の実施とバイオフィルムを形成させないための医療・療養環境の管理が重要である。

Key words : メタロ-β-ラクタマーゼ, 緑膿菌, バイオフィルム, 院内感染

はじめに

緑膿菌は湿潤環境を好み、土壌や水周りなど日常生活環境に普遍的に生息する細菌であり、健常人は緑膿菌による感染症を発症することはないが、入院中の高齢者や小児など免疫機能が低下した患者は感染症を引き起こすことがある。また、緑膿菌は菌体周囲に多糖体を産生してバイオフィルムを形成し、間接的に粘膜に付着するた

め粘膜刺激性が少なく、定着した粘膜において長期にわたり生息し感染が再燃する¹⁾。バイオフィルム形成能が高い緑膿菌は、生体内に限らず、長期間使用している医療器具にもバイオフィルムを形成し、化学的・物理的処りに抵抗性を示す²⁾。

近年、カルバペネム系・フルオロキノロン系・アミノ配糖体系の三系統全ての抗菌薬に対し耐性を示す多剤耐性緑膿菌 (MDRP) の分離例が報告されるようになった³⁻⁵⁾。MDRP の多剤耐性化の機序には、不活化酵素の産生、作用点の変異、透過性障害、排出ポンプ機能の

岡山大学大学院 ¹⁾保健学研究科, ²⁾医歯薬学総合研究科,
³⁾現 山陽学園大学看護学部

亢進などがある。なかでもメタローβ-ラクタマーゼ (MBL) 産生緑膿菌は、プラスミド性耐性遺伝子を保有し、耐性遺伝子が菌種を超えて急速に拡散する可能性がある。MBL 産生緑膿菌は複数の耐性遺伝子を効率よく取り込むことのできるインテグロン構造をプラスミド上に有するため、カルバペネム系抗菌薬だけでなく、アミノ配糖体耐性遺伝子や第4級アンモニウム塩に対する耐性も同時に有していると推測されている⁶⁾。バイオフィーム形成能の高い緑膿菌は、薬剤耐性率が高く多剤耐性傾向を示す⁷⁾。MDRP に感染すると、ほぼ全ての抗菌薬に耐性を示すだけでなく、バイオフィーム形成により治療のさらなる難渋が危惧される。

MDRP 感染症は 1999 年から感染症法の五類感染症定点把握疾患に指定されている。MDRP の分離率は 2.75%³⁾、MBL 産生緑膿菌 0.81%⁸⁾ という報告があるが、定点施設からの報告数は漸増傾向にある⁹⁾。院内感染対策の社会情勢をみると、2003 年の医療法施行規則改正により、医師、看護師、薬剤師等が、特定機能病院において専任の院内感染対策担当者として、院内感染対策に関する企画立案及び評価、病院職員の院内感染対策に関する意識の向上や指導等の業務を行うことが追加された¹⁰⁾。さらに 2007 年には医療施設の従事者に対して院内感染防止の研修を実施することが義務づけられ¹¹⁾、各医療施設において、院内感染対策チーム (ICT) を中心として、全ての医療従事者が院内感染防止対策を実践することが求められている。

本研究では、A 県 3 施設で入院患者より分離された MBL 産生緑膿菌のバイオフィーム形成能と薬剤耐性状況を検討し、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法による分子疫学的解析を行った。さらに、感染管理上の視点から、MBL 産生緑膿菌や MDRP の伝播・拡散防止対策について考究した。

対象と方法

1. 対象菌株

A 県 3 施設で 2001 年から 2006 年の 6 年間に入院患者より分離され、岡山大学泌尿器科において PFGE 法による遺伝子解析を行った MBL 産生緑膿菌 123 株を対象とした。MBL 産生緑膿菌が分離された施設の概要は、2 施設 (施設 A・B) が 500 床以上の大規模病院、1 施設 (施設 C) が 199 床以下の小規模病院であり、3 施設とも ICT が組織され活動していた。比較対象として、1997～2006 年の 10 年間に岡山大学泌尿器科において分離された尿路感染症由来 MBL 非産生緑膿菌 122 株を用いた。対象株は 1 症例 1 株を原則とした。MBL 産生緑膿菌 123 株の材料別内訳は、尿 79 株 (64.2%)、喀痰 10 株、便 10 株、膿 5 株、血液 2 株、その他 17 株であった。

2. PCR 法

*bla*_{IMP-1} 遺伝子保有の確認は、柴田らの報告¹²⁾したプライマーを用いて行った。普通寒天培地上に一晩培養した供試菌を 50 μL の 7.5% キレックス 100 (Bio-Rad) に懸濁し、100°C・10 分間熱処理後遠心し、その上清を DNA 調製液として使用した。*TaKaRa Taq*TM を用い、PCR バッファー・dNTP・プライマー・*Taq* DNA ポリメラーゼの混液を調製し、DNA 調製液を加え (総容量 25 μL)、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR Systems 9700; Applied Biosystems) にて反応を開始した。熱変性・アニーリング・伸長反応は柴田らの報告¹²⁾に準じて行った。各反応液を 2% アガロースゲルに装填し、GelMate2000 (TOYOBO) にて電気泳動後、エチジウムプロマイドで染色し、UV トランスイルミネーターにて撮影した。

3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性の測定にはドライプレート DP25 (栄研化学) を用い、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準じた微量液体希釈法¹³⁾により行った。MDRP の判定基準となる 3 剤イミペネム (IPM)、シプロフロキサシン (CPFX)、アミカシン (AMK) の耐性判定は、感染症法に基づき MIC (最小発育阻止濃度) 値: IPM ≥ 16 μg/mL, CPFX ≥ 4 μg/mL, AMK ≥ 32 μg/mL とした。

4. バイオフィームアッセイ

バイオフィーム形成能の定量化にはマイクロプレート法¹⁴⁾を用いた。トリプトソイブイオン培地 (TSB, 日水製薬) 中、供試菌を 37°C 一晩培養、TSB にて 100 倍希釈し、96 穴ポリスチレン製滅菌平底プレート (Nunc) に 200 μL ずつ 3 穴に分注した。37°C で 24 時間静置培養後、プレートの各穴を 300 μL の蒸留水で 3 回洗い、10 分間乾燥させた後、0.3% クリスタルバイオレット (200 μL/穴) で 45 分間染色した。同様に再度蒸留水で洗い乾燥させた後、付着したクリスタルバイオレットを 5% 酢酸エタノール (300 μL/穴) に溶解させ、その溶出液を新しいマイクロプレートに 100 μL ずつ移し、マイクロプレートリーダーで吸光測定 (OD₅₇₀ 値) を行った。3 穴の平均 OD₅₇₀ 値を求め、その値をバイオフィーム形成能とし、高度形成群 (OD₅₇₀ ≥ 1)、中等度形成群 (1 > OD₅₇₀ ≥ 0.5)、低度形成群 (0.5 > OD₅₇₀ ≥ 0) の 3 群に分類した¹⁵⁾。

5. 統計学的解析

データの解析は Fisher の直接法および Mann-Whitney の U 検定を用い、p < 0.05 の場合を有意差ありとした。

6. PFGE 法

供試菌を 0.5 mL TSB 中、37°C で一晩培養し、遠心後、沈渣に懸濁バッファー (10 mM Tris pH7.2, 20 mM

NaCl, 50 mM EDTA · 2Na)を 0.5 mL 加え懸濁した。55°C に加温した 1.2% アガロースゲル (BIO-RAD) 50 μL に再懸濁した菌液を等量混合し、ゲルブロックを作製した。固まったゲルブロックを 24 穴プレートに入れ、リゾチーム溶液 (10 mM Tris pH 7.2, 50 mM NaCl, 0.2% sodium desoxycholate, 0.5% sodium lauryl sarcosine, 1 mg/mL リゾチーム) を 0.5 mL ずつ加え、37°C で 2 時間緩やかに振盪して溶菌処理を行った後、プロテナーゼ K 溶液 (100 mM EDTA · 2Na pH 8.0, 50 mM NaCl, 0.2% sodium desoxycholate, 1% sodium lauryl sarcosine, 1 mg/mL プロテナーゼ K) 0.5 mL に交換し、50°C 一晩静置して蛋白分解を行った。ゲルブロックを洗浄バッファー (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA · 2Na pH 8.0) で洗浄後、1 mm 幅程度に切断し、Spe I バッファー (10 U/200 μL, New England Biolabs) で DNA を消化した。0.8% アガロースゲル (BIO-RAD) に制限酵素処理したゲルを包埋し、CHEF DR-III (BIO-RAD) にて泳動した。泳動条件は電圧 6 V/cm, パルスタイム 1~23 秒, 泳動時間は 18.5 時間, 泳動バッファー温度 14°C, サイズマーカーはラムダラダー (BIO-RAD), バッファーは 0.5 × TBE (44.5 mM Tris, 44.5 mM ホウ酸, 1 mM EDTA · 2Na pH 8.0) を用いた。泳動終了後、アガロースゲルを 1 × SYBR Green I (Molecular Probes) で染色し、GelDoc XR (BIO-RAD) にて撮影した。クラスター解析には、Fingerprinting II (BIO-RAD) を使用した。

結 果

1. MBL 産生緑膿菌株の薬剤耐性状況

MBL 産生緑膿菌 123 株のうち、IPM · CPIX · AMK の 3 剤耐性 (MDRP) が 106 株 (86.2%)、2 剤耐性が 13 株 (10.5%)、1 剤耐性が 4 株 (3.3%) であった。2 剤耐性 13 株中、IPM · CPIX 耐性が 11 株、IPM · AMK 耐性が 2 株であった。3 剤耐性 (MDRP) 106 株の材料別内訳は、尿 70 株 (66.0%) · 便 10 株 · 喀痰 6 株 · 膿 4 株 · 血液 2 株 · その他 14 株であった。施設別

に薬剤耐性状況をみると、施設 A (78 株) は 3 剤耐性が 63 株 (80.8%)、IPM · CPIX の 2 剤耐性が 9 株 (11.5%)、IPM · AMK の 2 剤耐性が 2 株 (2.6%)、IPM の 1 剤耐性が 4 株 (5.1%) であった。施設 B (38 株) は 3 剤耐性が 36 株 (94.7%)、IPM · AMK の 2 剤耐性が 2 株 (5.3%) であった。施設 C (7 株) は全株 (100%) が 3 剤耐性であった (表 1)。

2. MBL 産生緑膿菌株および MBL 非産生緑膿菌株のバイオフィーム形成能

MBL 産生緑膿菌 123 株のうち、バイオフィーム高度形成群は 29 株 (23.6%)、中等度 47 株 (38.2%)、低度 47 株 (38.2%) であった。MDRP は、高度形成群 29 株中 27 株 (93.1%)、中等度形成群 47 株中 44 株 (93.6%)、低度形成群 47 株中 35 株 (74.5%) であった。材料別では、尿由来株は高度形成群 29 株中 23 株 (79.3%)、中等度形成群 47 株中 34 株 (72.3%)、低度形成群 47 株中 22 株 (46.8%) であり、他の材料別由来株より高いバイオフィーム形成能を示す株が多く認められた。

MBL 産生緑膿菌 123 株のバイオフィーム形成能の平均 OD₅₇₀ 値は 0.71 ± 0.04 (mean ± SE) であった。一方、MBL 非産生緑膿菌 122 株は 0.28 ± 0.04 (mean ± SE) であり、MBL 産生緑膿菌株が有意に高い (p < 0.001) バイオフィーム形成能を示した (図 1)。

MBL 産生緑膿菌 123 株のバイオフィーム形成能を施設別に比較すると、施設 A では高度から低度まで広く分布し平均 OD₅₇₀ 値は 0.57 ± 0.05 (mean ± SE) であった。施設 B では低度形成群に属する菌株が少なく、主に高度から中等度にかけて分布していた。平均 OD₅₇₀ 値は 1.03 ± 0.07 (mean ± SE) であり、他の 2 施設に比べて平均 OD₅₇₀ 値が約 2 倍の高値を示した。施設 C では高度形成群に属する菌株はなく中等度から低度に分布し、平均 OD₅₇₀ 値 0.48 ± 0.06 (mean ± SE) であった (表 1)。

3. MBL 産生緑膿菌株の PFGE 解析

MBL 産生緑膿菌 123 株のデンドログラムを作成した結果、類似係数 100% の同一株は認めなかった。類似係

表 1 施設別の薬剤耐性状況とバイオフィーム形成能

		施設 A (n=78)	施設 B (n=38)	施設 C (n=7)
薬剤耐性	IPM · CPIX · AMK	63 (80.8%)	36 (94.7%)	7 (100%)
	IPM · CPIX	9 (11.5%)	2 (5.3%)	0
	IPM · AMK	2 (2.6%)	0	0
	IPM	4 (5.1%)	0	0
バイオフィーム形成能	高度 (OD ₅₇₀ ≥ 1)	13 (16.7%)	16 (42.1%)	0
	中等度 (1 > OD ₅₇₀ ≥ 0.5)	23 (29.5%)	20 (52.6%)	4 (57.1%)
	低度 (0.5 > OD ₅₇₀ ≥ 0)	42 (53.8%)	2 (5.3%)	3 (42.9%)
	平均 OD ₅₇₀ 値 (mean ± SE)	0.57 ± 0.05	1.03 ± 0.07	0.48 ± 0.06

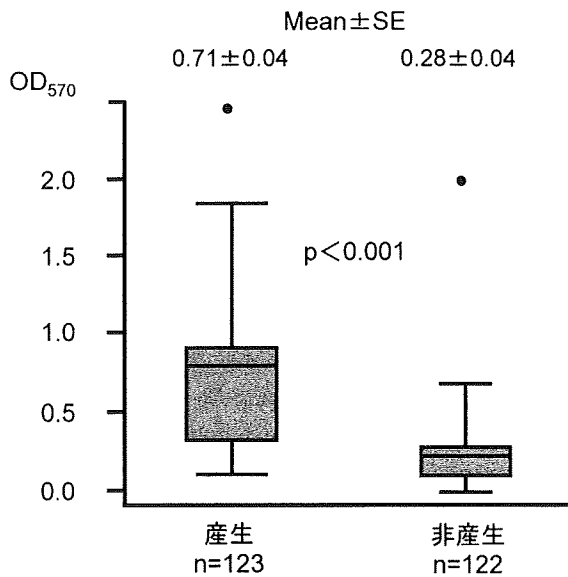


図1 MBL産生・非産生緑膿菌のバイオフィーム形成能の比較

数50%で24組(88株), 70%で22組(51株)のクラスターが形成され(図2), 85%の類似株を12組認めた(図3). 類似株12組24株のバイオフィーム形成能別の株数は, 高度形成群(5株), 中等度形成群(8株), 低度形成群(11株)であった. 24株中19株が3剤耐性のMDRP, 3株が2剤(IPM・CPFX)耐性, 2株が1剤(IPM)に耐性であった. 施設別内訳は施設A(8組16株), 施設B(2組4株), 施設C(2組4株)であり, 異なる施設間での類似株は認めなかった. 材料別では尿13株, 喀痰5株, 便3株, その他3株であり, 尿由来株が過半数を占めていた. 施設Aの類似株8組中, 分離日の明確な6組(12株)については, 1組が同日, 1組が12日, 4組は1ヶ月から2ヶ月の分離日の隔たりがあった. 施設Bの2組(4株)は1組が20日, 1組が1ヶ月, 施設Cでは1組が4日, 1組が約3ヶ月の分離日の隔たりがあった.

考 察

A県3施設で入院患者より分離されたMBL産生緑膿菌123株のバイオフィーム形成能はMBL非産生緑膿菌より有意に高く, 106株(86.2%)がIPM・CPFX・AMKの3剤に耐性を示すMDRPであった. バイオフィーム形成能の平均OD₅₇₀値は, 施設Bが1.03, 施設AとCはそれぞれ0.57と0.48であり, 施設Bでは高いバイオフィーム形成能を示す株が多く認められた. 施設Bの分離株についてPFGE解析を行った結果, 類似株4株中3株がバイオフィーム高度形成群, 1株が中等度形成群に属する菌株であり, 低度形成群に属する菌株はなかった. 一方, 施設Aの78株は高度形成群から低

度形成群まで広く分布していたが, 類似株(8組16株)のうち, 5組10株は低度形成群に属する菌株であった. つまり, バイオフィーム形成能の高い株が必ずしも類似株ではないことが明らかとなった. またPFGE解析では, 類似性の高い菌株は少なく, 特定の菌株が施設内で広がっている可能性の低いことが示唆された. しかし, MBL産生緑膿菌は菌自体の伝播・拡散だけでなく, プラスミドを介したMBL産生遺伝子の菌株・菌種間の伝達が問題となる. PFGE解析では菌株間の相同性を捉えることはできるが, プラスミド性耐性遺伝子の拡散を捉えることはできない. バイオフィーム形成能の高い菌株は, 環境中に長期に生息し, 複数の菌株・菌種により形成されたバイオフィーム内部でプラスミド性耐性遺伝子を伝達する可能性がある^{16,17}. つまりPFGE解析では類似性が認められなかった菌株が, プラスミド性耐性遺伝子の伝達により耐性を獲得している可能性があり, バイオフィーム形成能の高いMBL産生緑膿菌は院内感染対策上, 特に留意することが重要である.

厚生労働省統計によると, 全入院患者の34.8%が75歳以上の高齢者である(2005年度)¹⁸. 入院患者や介護施設入所者のうち高齢者の50%以上に尿失禁が認められ¹⁹, 看護・介護職による尿失禁・排泄ケアが必要となり, その際尿・排泄物に接触する機会が多くなる. また, 高齢者やハイリスク患者は, 心肺機能の予備能力や咳嗽反射の低下から喀痰喀出が困難となり, 看護師による気管内吸引が必要となる. 本研究において対象としたMBL産生緑膿菌123株が分離された材料別内訳は, 尿由来が79株(64.2%)と最も多く, 次いで喀痰や便由来であった. つまり看護師は, MBL産生緑膿菌分離率の高い尿や喀痰などに触れる頻度が高く, MBL産生緑膿菌を伝播・拡散させる可能性が高い.

PFGE解析の結果, 類似株12組24株のうち, 尿や便から分離された菌株の類似株は7組14株であった. この7組の類似株の分離日に, 4日から約3ヶ月の隔たりがあり, 直接的な交差感染だけでなく, 手洗い・器具洗浄用流し台などの周囲環境^{2,20}に生息していたMBL産生緑膿菌が変異し, 間接的に伝播した可能性が推察された. 手洗い・器具洗浄用流し台周辺は, 看護師が共同で頻回に使用する場所であり, 複数の看護師がMBL産生緑膿菌を伝播・拡散させる危険性を孕んでいることは否めない. しかし, 擦式手指消毒教育を受けた新人看護師でさえも手指消毒遵守率は70.6%と低く²¹, MDRPが看護師の手を介して伝播した例もある²². その伝播を防止するには, 手指衛生の遵守とともに, 手袋着用による接触感染予防策が大切となる.

緑膿菌は増殖不利な環境下において, 菌体表面に多糖体(グリコカリックス)を産生し互いに凝集被覆し, 膜状を呈するバイオフィームを形成する. そしてバイオフィ

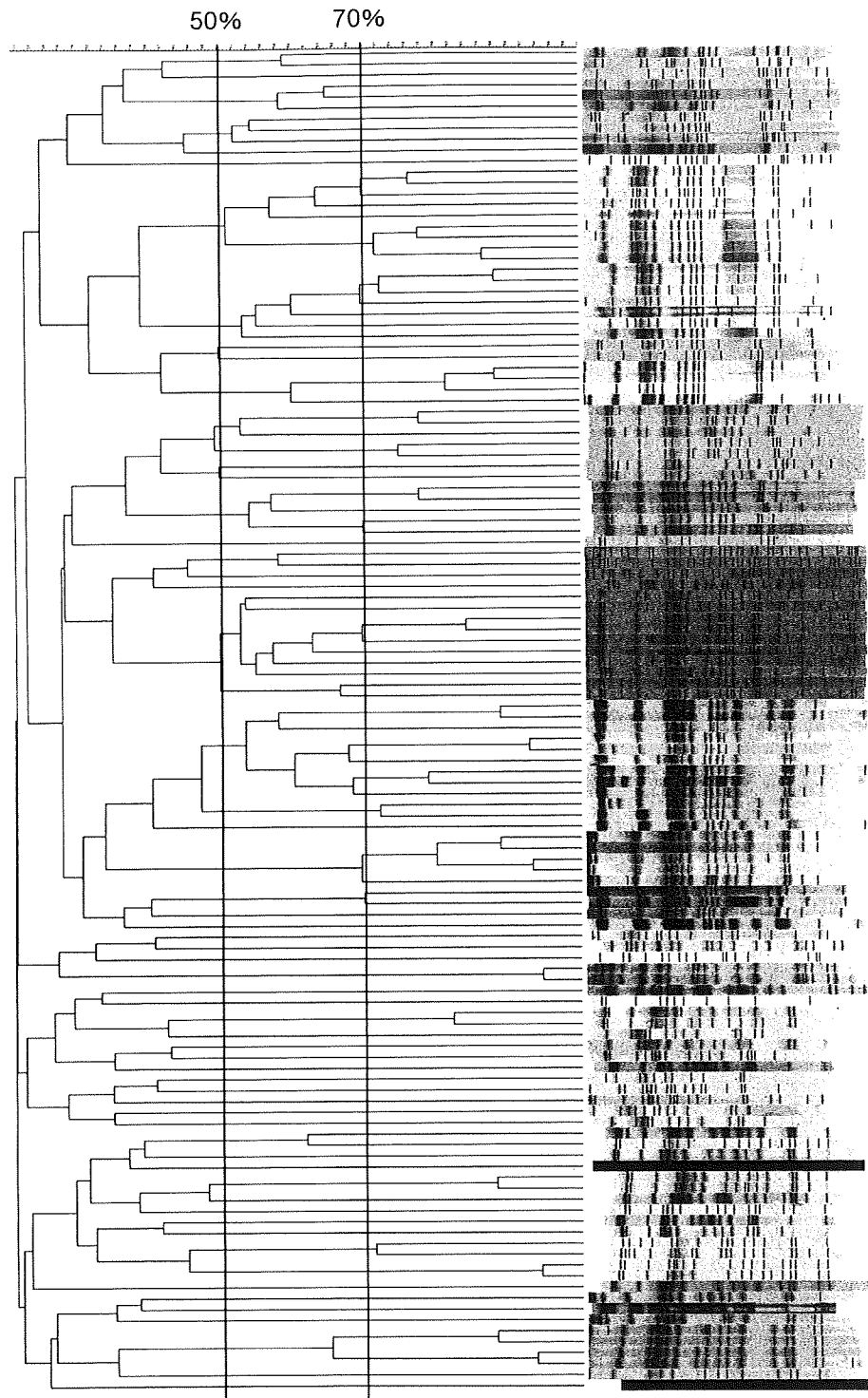


図2 MBL産生緑膿菌123株のデンドログラム

ルムを介して粘膜や医療器具などに定着する²⁾。尿路バイオフィーム感染症のなかで、緑膿菌はカテーテル留置症例においてバイオフィームを形成しやすく、難治性となることが多い¹⁾。本研究において対象としたMBL産生緑膿菌123株中、79株(64.2%)が尿由来株あり、バイオフィーム高度・中等度形成群76株のうち、57株

(75.0%)が尿由来株であった。抗菌薬の多くは腎排泄型であり、尿中に排泄された抗菌薬は高濃度となるため、尿中の菌株は多剤耐性と高度耐性を獲得しやすい²³⁾。尿由来79株中、70株(88.6%)はIPM・CPFX・AMKの3剤に耐性を示すMDRPであった。尿路バイオフィーム感染症では、尿路カテーテルの閉塞による尿流障害

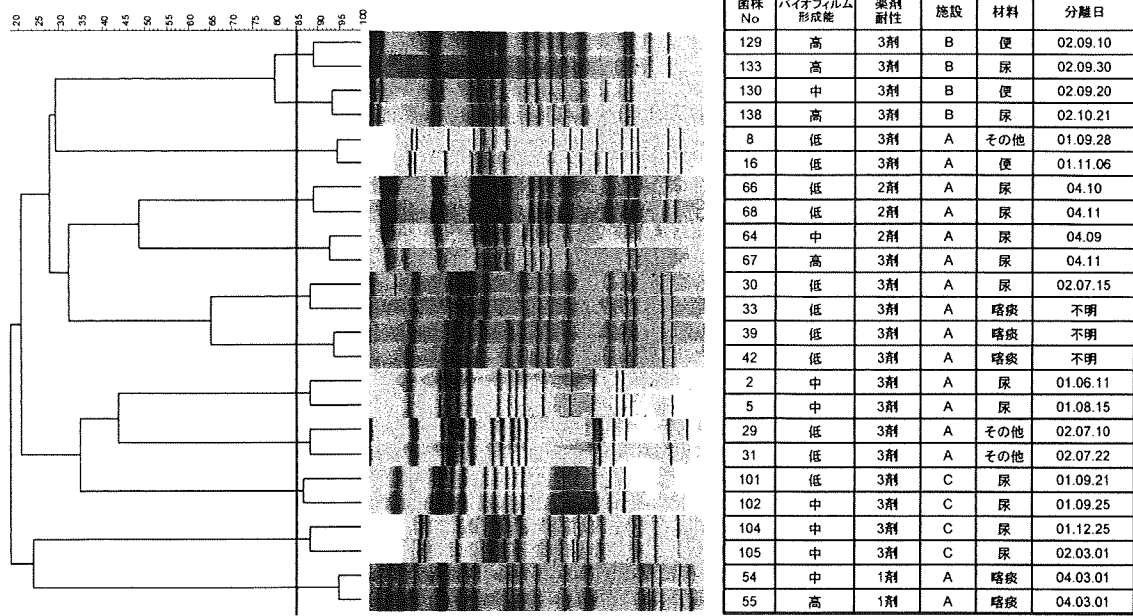


図3 MBL産生緑膿菌24株(類似係数85%)のデンドログラム

が生じると尿路内圧が急激に上昇し、細菌の機械的な腎実質および血中への侵入により重篤な感染症を引き起こすことがある¹⁾。バイオフィルム形成能の高い緑膿菌が尿路から分離された患者は、カテーテル内腔がバイオフィルムにより閉塞する危険性が特に高いことを考慮し、看護師は尿の流出状況を観察し重篤な感染症に移行させないよう留意することが重要である。カテーテル留置は医療関連尿路感染症の大きな因子である^{24,25)}こととMBL産生緑膿菌のバイオフィルム形成能が特に高いことを考慮すると、不用意なカテーテル留置は避け、患者の排泄の自立にむけた看護を推進することが肝要である。一方、MDRPがカテーテルの排尿口を介して伝播し、排尿容器洗浄ブラシを共有したことから尿路感染症のアウトブレイクを引き起こした事例もある²⁰⁾。バイオフィルム形成能が高い緑膿菌は環境に生息しやすいことを考慮すると、水周りの環境を清潔に乾燥した状態に保ち、バイオフィルム形成の場とならないよう医療環境の管理を徹底する必要がある。またカテーテル留置の操作手順だけでなく、蓄尿の適応を厳密に管理するとともに尿の廃棄方法に至るまで、MBL産生緑膿菌やMDRPを伝播・拡散させない手順を看護師に周知させることが重要である。

PFGE解析の結果、喀痰からの分離株中に2組4株の類似株を認めたことから、気管内吸引カテーテルに接続するゴム管や吸引ボトルなどの環境中に生息していたMBL産生緑膿菌が看護師の吸引手技を介して伝播した可能性は否定できない。看護師は、気管内吸引の清潔操作に留意することはもとより、吸引前後の手指衛生を行

い、喀痰の飛沫を防護するためのマスクやエプロンを着用し標準予防策を徹底することが重要である。吸引処置を受ける患者は尿路カテーテルを留置していることも少なくない。同一患者に排泄ケアや吸引処置などのケアを集中して行う際には、汚染部位から清潔部位への伝播防止のために一処置毎の手指衛生の遵守も重要である。急性期病院に入院した誤嚥性肺炎患者が退院時においても耐性菌や日和見感染の原因菌を口腔や気道に多量に定着させており、医療施設内における口腔ケアが不十分であることが指摘されている²⁶⁾。吸引手技の清潔操作を徹底することに加え、口腔内の清浄度を保ち、バイオフィルム(歯垢)を形成させないように口腔ケアを十分に行うことも重要である。

MDRPは五類感染症定点把握疾患に指定され、注意を喚起されてきているが、全数把握の感染症ではない。大規模病院においてはMBL産生緑膿菌やMDRPに対する関心度は高いが、中・小規模病院や療養型施設では薬剤耐性菌に関する情報提供が組織的になされているとは言い難い。MDRPは必ずしも感染症の起因菌となっていない場合が多く²³⁾、保菌した状態で原疾患の治療や医療処置を受けていることを考慮すると、大規模病院に限らず、中・小規模病院においても院内感染対策としてMBL産生緑膿菌やMDRPの感染管理対策を周知徹底させていくことは重要である。大規模病院は急性期・高度医療を担うため易感染患者が多く、MBL産生緑膿菌やMDRPの伝播・拡散を防止するためには、現場の医師のみならず看護師にも耐性菌分離状況に関する情報提供を迅速に行うことが重要である。つまり看護師は、

病棟内の分離菌や薬剤感受性状況を把握し、エビデンスに基づいた院内感染防止対策を実践することが肝要である。

本研究において、バイオフィーム形成能が高い MBL 産生緑膿菌や MDRP が生息している施設を認めた。バイオフィーム形成能が高い菌株は環境中に長期に生息し、プラスミド性耐性遺伝子が菌株・菌種間で伝達する可能性が高い^{16,17)}。バイオフィーム形成能が高い MBL 産生緑膿菌には、院内感染対策上、特に留意する必要がある。MBL 産生緑膿菌や MDRP の伝播・拡散防止のためには、徹底した標準予防策の実施とバイオフィームを形成させないための医療・療養環境の管理が重要である。

謝辞：本研究は厚生労働科学研究費補助金(平成 19-21 年度：H19-医療一般-007)および科学研究費補助金(基盤 C, 平成 18-20 年度, No. 18591753)による助成を受けて行った。

文 献

- 1) 門田晃一, 公文裕巳: 尿路バイオフィーム感染症の課題と展望. 日化療会誌 2003; 51(7): 426-30.
- 2) 片田裕子, 佐藤美友紀, 今西信子, 吉井美穂, 落合宏: 環境由来およびヒト由来緑膿菌のバイオフィーム形成能と消毒薬感受性に関する研究. 富山医薬大看会誌 2005; 6(1): 45-53.
- 3) Tsuji A, Kobayashi I, Oguri T, Inoue M, Yabuuchi E, Goto S: An epidemiological study of the susceptibility and frequency of multiple-drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at medical institutes nationwide in Japan. J Infect Chemother 2005; 11(2): 64-70.
- 4) Laupland KB, Parkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, et al.: Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo- β -lactamase (MBL)-producing strains. J Infect Dis 2005; 192(9): 1606-12.
- 5) 岡 陽子: 多剤耐性緑膿菌に対する抗菌薬の併用効果. 日化療会誌 2005; 53(8): 476-82.
- 6) 石井良和: 緑膿菌が産生する β ラクタマーゼの種類とその特徴. 緑膿菌感染研究会講記録 2008; 42: 15-9.
- 7) 渡辺豊彦, 上原慎也, 光畑律子, 和田耕一郎, 石井亜矢乃, 狩山玲子, 他: 尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィーム形成能と臨床的因子および薬剤感受性との関連性に関する検討. 緑膿菌感染研究会講記録 2007; 41: 94-8.
- 8) Tsuchimochi N, Takuma T, Shimono N, Nagasaki Y, Uchida Y, Harada M: Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiological analysis of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Chemother 2008; 14(2): 99-104.
- 9) 国立感染症研究所感染症情報センター: 感染症報告教一覧(その 2: 定点把握) <http://idsc.nih.gov/idwr/ydata/report-Jb.html>
- 10) 厚生労働省医政局長通知: 「医療法施行規則の一部を改正する省令」の施行(特定機能病院に専任の院内感染対策を行う者を配置すること等に係る改正関係)について。(平成 15 年 11 月 5 日 医政発第 1105010 号)
- 11) 厚生労働省医政局長通知: 良質な医療を提供する体制の確立を図るための医療法等の一部を改正する法律の一部の施行について。(平成 19 年 3 月 30 日 医政発第 0330010 号)
- 12) 柴田尚宏, 土井洋平, 荒川宣親: メタロ- β -ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌. 臨検 2001; 45: 840-50.
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; informational supplement (M100-S17), Edition 17, 2007.
- 14) O'Toole GA, Kolter R: Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 1998; 28(3): 449-61.
- 15) Møretrø T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S: Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. Appl Environ Microbiol 2003; 69(9): 5648-55.
- 16) Donlan RM: Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002; 8(9): 881-90.
- 17) Davey ME, O'toole GA: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64(4): 847-67.
- 18) 厚生労働省統計データベースシステム: 患者調査; 1 上巻第 2 表(その 4)推計患者数の年次推移, 入院-外来×性・年齢階級別(平成 11 年~17 年). http://www.dbtk.mhlw.go.jp/toukei/data/150/2005/toukeihyou/0005871/t0131950/JD0002_001.html
- 19) 岡村菊夫: 高齢者尿失禁の評価・治療に関するガイドラインの作成. 平成 12・13 年度総合研究報告書. 厚生科学研究補助金(長寿科学総合研究事業).
- 20) 吉本静雄, 岡内里美, 鉦谷久美子: 多剤耐性緑膿菌による尿路感染症アウトブレイクの疫学的検討と感染対策. 環境感染誌 2005; 20(1): 37-43.
- 21) 山本満寿美, 千田好子: 新人看護師に対する擦式手指消毒教育の実施と評価. 環境感染誌 2006; 21(1): 51-5.
- 22) Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, et al.: Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2005; 43(3): 1198-204.
- 23) 荒川宣親: アシネトバクター等多剤耐性グラム陰性桿菌に関する調査研究. 平成 13 年度厚生科学研究補助金. 厚生科学特別研究事業.
- 24) Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al.: Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2003; 37(1): 26-32.
- 25) Graves N, Tong E, Morton AP, Halton K, Curtis M, Lairson D, et al.: Factors associated with health care-acquired urinary tract infection. Am J Infect Control 2007; 35(6): 387-92.
- 26) 形山優子, 山本満寿美, 千田好子, 狩山玲子: 誤嚥性肺炎患者の口腔内の状態と口腔ケアおよび口腔と吸引痰からの検出菌に関する実態調査. 環境感染誌 2008; 23(2): 97-103.

[連絡先: 〒700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 狩山玲子
E-mail: kariyama@md.okayama-u.ac.jp]

Biofilm-forming Capabilities and Molecular Epidemiological Analysis of Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*

Masumi YAMAMOTO¹⁾, Reiko KARIYAMA²⁾, Ritsuko MITSUHATA²⁾, Hiromi KUMON²⁾ and Yoshiko SENDA^{1,3)}

¹⁾Graduate School of Health Sciences, Okayama University

²⁾Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

³⁾Presently Sanyo Gakuen University, Department of Nursing

Abstract

The biofilm-forming capabilities and antimicrobial resistance of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates were investigated and a molecular epidemiology study conducted using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). A total of 123 metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates, including 79 isolates from urine, 10 isolates from sputum, 10 isolates from feces, 5 isolates from pus, 2 isolates from blood and 17 isolates from other sites, were collected from patients (one isolate per patient) admitted to three hospitals from 2001 through 2006. Of the 123 isolates, 106 (86.2%) isolates were resistant to imipenem, ciprofloxacin and amikacin, indicating multiple-drug-resistant *P. aeruginosa* (MDRP). The *in vitro* microtiter plate assay was used to quantify biofilm formation into three groups: strong ($OD_{570} \geq 1$) in 29 (23.6%), medium ($OD_{570} \geq 0.5$ to < 1) in 47 (38.2%), and weak ($OD_{570} \geq 0$ to < 0.5) in 47 (38.2%). The biofilm-forming capabilities of metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates (mean \pm SE 0.71 ± 0.04 [$n = 123$]) were significantly greater than those of non-producing isolates (mean \pm SE 0.28 ± 0.04 [$n = 122$]). Of the 76 isolates with strong and medium biofilm formation, 71 (93.4%) isolates were MDRP and 57 isolates (75.0%) were urine isolates. PFGE analysis showed that no identical isolates were found among the 123 metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates, but 12 paired isolates were found at a similarity level of 85%. Of the 12 pairs, one pair was found on the same day, and other pairs were found within 4-day to 3-month intervals. The persistent biofilms formed by metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* isolates could cause serious problems in hospital acquired infections. The development of strategies to prevent the spread of this organism in the hospital setting is needed.

Key words : metallo- β -lactamase, *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, hospital acquired infection

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	頁
前田博史、苔口進、高柴正悟	第4章 歯周病の発生因子(リスクファクター) 1- バイオフィルム—感染症の立場から(菌と菌のインターアクション)	鴨井久一・花田信弘・佐藤勉・野村義明	Preventive Periodontology	医歯薬出版株式会社	東京	2007	165-174
泉福英信	口腔ケアの効果の実際; 医療連携による在宅歯科医療	箱崎守男、石井拓男、角町正勝	医療連携による在宅歯科医療	日本歯科評論社	東京	2008	172-177

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Ino T, Tada A, Tominaga A, Komori Y, Chiba H, and Senpuku H.	Glycosylation of the OMP85 homolog of <i>Porphyromonas gingivalis</i> and its involvement in biofilm formation.	International Journal of STD & AIDS	18	556-565	2007
Nakao R, Tashiro Y, Nomura N, Kosono S, Ochiai K, Yonezawa H, Watanabe H and Senpuku H.	Glycosylation of the OMP85 homolog of <i>Porphyromonas gingivalis</i> and its involvement in biofilm formation.	Biochemical and Biophysical Research Communications	365	784-789	2008

泉福英信	歯科医療機関における院内感染対策の導入について	日本歯科評論	774	135-140	2007
Kumada M, Senpuku H, Motegi M, Ryoma Nakao, Yonezawa H, Yamamura H, Watanabe H and Tagami J	Effects of <i>Enterococcus faecium</i> on <i>Streptococcus mutans</i> biofilm formation using flow cell system	Journal of Oral Biosciences	50	68-76	2008
Mikuniya T, Kato Y, Ida T, Maebashi K, Monden K, Kariyama R, Kumon H	Treatment of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model.	J Infect Chemother	13	285-290	2007
狩山玲子、門田晃一、公文裕巳	緑膿菌性尿路感染症対策としての抗バイオフィルム剤探索とその基盤技術の開発	第41回緑膿菌感染症研究会講演記録	41	39-43	2007
渡辺豊彦、上原慎也、光畑律子、和田耕一郎、石井亜矢乃、狩山玲子、門田晃一、公文裕巳	尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィルム形成能と臨床的因子および薬剤感受性との関連性に関する検討	第41回緑膿菌感染症研究会講演記録	41	94-98	2007
野村佳代、大野勝雄、光畑律子、渡邊久美、犬飼昌子、狩山玲子、千田好子	再使用した気管内吸引カテーテルの走査型電子顕微鏡による汚染状況の比較検討.	INFECTION CONTROL メディカ出版	16	86-90	2007

野村佳代、大野勝雄、 光畑律子、渡邊久美、 犬飼昌子、狩山玲子、	再使用した気管内吸引カテーテ ルの走査型電子顕微鏡による汚 染状況の比較検討.	INFECTION CONTROL メディ カ出版	16	86-90	2007
Soga Y, Saito T, Nishimura F, Ishimaru F, Mineshiba J, Mineshiba F, Takaya H, Sato H, Kudo C, Kokeguchi S, Fujii N, Tanimoto M, Takashiba S.	Appearance of multidrug -resistant opportunistic bacteria on the gingival during leukemia treatment.	J Periodontol	79	181-186	2008
Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Yoshizawa S, Iwata H, Kokeguchi S, Takashiba S, Nishimura F.	Macrophage-adipocyte interaction: marked interleukin-6 production by lipopolysaccharide.	Obesity	15	2549-52	2007
Yamazaki K, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Kudoh C, Takashiba S, Kokeguchi S, Nishimura F, Kodama	Relationship of periodontal infection to serum antibody levels to bacteria and inflammatory markers in periodontitis patients with coronary heart disease	Clin Exp Immunol	149	445-452	2007
佐藤法仁、渡辺朱理、 苔口 進、福井一博	歯科臨床実習生における感染制 御専門資格および組織に関する 認知度調査	INFECTION CONTROL	16	94 (588) -98 (592)	2007
佐藤法仁、渡辺朱理、 苔口 進、福井一博	独立行政法人大学評価・学位授 与機構における「学士（口腔保 健学）」の新設について。日本 歯科衛生学会雑誌 2 巻 1 号, 55-61, 2007.	日本歯科衛生学 会雑誌	2	55-61	2007

Yonezawa H, Kuramitsu HK, Nakayama S, Mitobe J, Motegi M, Nakao R, Watanabe H and Senpuku H	Differential expression of the Smb bacteriocin in <i>Streptococcus mutans</i> isolates.	Antimicrob Agents Chemother.	52	2742-2749	2008
Kokubu K, Senpuku H, Tada A, Saotome Y and Uematsu H.	Impact of routine oral care on opportunistic pathogens in institutionalized elderly.	Journal of Medical and Dental Science	55	7-13	2008
泉福英信、熊田昌 幸、田上順次H	細菌間相互作用における乳酸菌の 口腔バイオフィルム形成抑制効果	日本歯科評論	789	39-40	2008
Tashiro Y, Nomura N, Nakao R, Senpuku H, Kariyama R, Kumon H, Kosono S, Watanabe H, Nakajima T, Uchiyama H	Opr86 is essential for viability and is a potential candidate for a protective antigen against biofilm formation by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Journal of Bacteriology	190	3969-3978	2008
門田晃一、狩山玲 子、公文裕巳	緑膿菌性尿路感染症:どう対峙する か	第42回緑膿 菌感染症研究 会講演記録	42	27-30	2008

山本満寿美、狩山玲子、光畑律子、石井亜矢乃、上原慎也、渡辺豊彦、門田晃一、公文裕巳、草野展周	メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィルム形成能と耐性遺伝子伝達性の検討	第 42 回緑膿菌感染症研究会講演記録	42	95-99	2008
形山優子、山本満寿美、千田好子、狩山玲子	誤嚥性肺炎患者の口腔内の状態と口腔ケアおよび口腔と吸引痰からの検出菌に関する実態調査	日本環境感染学会誌	23	97-103	2008
森みずえ、千田好子、光畑律子、狩山玲子	気管内吸引を必要とする長期在宅療養患者に対する感染管理と口腔ケアの実態調査	日本環境感染学会誌	24	27-35	2008
Sugiura Y, Soga Y, Nishide S, Kono K, Takahashi K, Fujii N, Ishimaru F, Tanimoto M, Nishimura F, Takashiba S	Evaluation of xerostomia in hematopoietic cell transplantation by a simple capacitance method device.	Support Care Cancer	16	1197-1200	2008
Ratnasari A, Hasegawa K, Yoshihara K, Nagaoka N, Koheguchi S, Nishigawa G, Fukui K, Minagi S	Deformation of mesh type stainless palatal plate of maxillary complete denture and the growth of microorganisms.	Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi.	52	555-558	2008
Yamabe K, Maeda H, Koheguchi S, Tanimoto I, Sonoi N, Asakawa S, Takashiba S	Distribution of Archaea in Japanese patients with periodontitis and humoral immune response to the components.	FEMS Microbiol Lett.	287	69-75	2008

Miyagawa J, Maeda H, Murauchi T, Kokeyuchi S, Yamabe K, Tanimoto I, Nishimura F, Fukui K, Takashiba S.	Rapid and simple detection of eight major periodontal pathogens by the loop-mediated isothermal amplification method.	FEMS Immunol Med Microbiol.	53	314-321	2008
Sugiura Y, Soga Y, Tanimoto I, Kokeyuchi S, Nishide S, Kono K, Takahashi K, Fujii N, Ishimaru F, Tanimoto M, Yamabe K, Tsutani S, Nishimura F, Takashiba S	Antimicrobial effects of the saliva substitute, Oralbalance®, against microorganisms from oral mucosa in the hematopoietic cell transplantation period.	Support Care Cancer	16	421-424	2008
佐藤法仁, 渡辺朱理, 苔口進	肝炎を中心とした医療関連感染に対する意識調査	日本環境感染学会誌	24	53-56	2009
佐藤法仁, 渡辺朱理, 苔口進	感染防止と歯科医療受診行動IV ~「感染予防対策」は患者が歯科医療施設を選択する際に重要なのか~	医学と生物学	153	14-20	2009
Erika Inaba, Hiroshi Uematsu, Yoshihide Nishiyama, Haruo Watanabe, and Hidenobu Senpuku	The role of anti-PAc (361-386) peptide SIgA antibody in professional oral hygiene of the elderly.	Gerodontology	26	259-267	2009
Shohei Tamura, Hideo Yonezawa, Mizuho Motegi, Ryoma Nakao, Saori Yoneda, Haruo Watanabe, Tsuneyoshi Yamazaki and Hidenobu Senpuku.	Inhibiting effects of <i>S. salivarius</i> on CSP-dependent biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i>	Oral Microbiology and Immunology	24	152-161	2009