

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）  
研究協力報告書

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能  
の強化に関する研究  
「アシネトバクター属菌の感染疫学解明に関する研究」

研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）

研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）

研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所）

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

研究要旨.

国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的として、国立感染症研究所が全国の国立病院から収集した 998 株のアシネトバクター属菌疑い菌について菌種同定を行った。また、*A.baumannii* の MLST 解析と次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解析データに基づいた *A. baumannii* International Clone II の系統樹解析と *A.baumannii* の薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。菌種同定を実施した結果、998 株中 866 株がアシネトバクター属菌であり、そのうち *A. baumannii* が 74%と最も多く、次いで *A. nosocomialis* 10%、*A. pittii*, 7%、*A. sp. close to 13TU* 2%と続くことが明らかとなった。MLST 解析の結果から秋田県と愛知県に *A. baumannii* International Clone II が侵淫していることが確認された。また SNP 系統樹解析の結果から、*A. baumannii* International Clone II についても地域に特異的な感染疫学が成立している可能性が示唆された。また、SNP 系統樹解析により、MDRA が他の *A. baumannii* International Clone II クラスタに属する株と異なる起源と感染疫学を持つ可能性が示唆された。確認された MDRA は 2 株のみであったが、院内感染防止策構築の基礎となる MDRA の感染疫学に関して、今後さらなる調査が必要である。

**A. 研究目的**

アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属菌は自然環境中に広く分布し、同じ非発酵菌である緑膿菌と同様にしばしば院内感染を惹起する。さらに、緑膿菌と異なり湿潤環境のみならず、乾燥状態にも耐えることから、ひとたび病院環境内に定着した場合、その除去は容易ではない。アシネトバクター属菌は 19 の Genomic Species に分類され、30 の reference strain が定められている (A.Y. Peleg, Clin.

Microbiol. Rev. 21, 538, 2008) が、従来の生化学的性状試験等では種の同定が困難である。とりわけ、医療機関において分離頻度が高いとされる *A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis*、*A. calcoaceticus* は性状がお互いに非常に類似しているために、従来法や医療機関等で汎用されている自動同定機器では鑑別が極めて困難であり、このことが国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学解明の大きな障害となってきた。実際、JANIS の集計は

医療機関における自動同定機による検査結果に立脚しているために、国内におけるアシネトバクター属菌の分離実態が正確に反映されているとは言い難く、その実態は混沌としているのが現状である。

2008 年秋から 2009 年 1 月に福岡大病院で多剤耐性アシネトバクター(MDRA)の院内感染が発生し、26 人が感染し 4 人が死亡するという院内感染事例が発生し、平成 22 年 2 月には帝京大学医学部附属病院で入院患者 46 名が MDRA に感染し、死亡者が計 27 名となる深刻な健康被害が発生した。このように、国内では MDRA による、深刻な健康被害を伴う院内感染が既に発生していることから対策を講じる必要があるが、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見は極めて乏しいことが対策構築上の問題である。

本研究は、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的として昨年度から実施した。研究初年度である昨年度は、秋田県と愛知県の医療機関において分離されたアシネトバクター属菌の菌種同定と薬剤感受性について検討し、*A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis*、*A. calcoaceticus*、*A. sp. Close to 13TU* の分離頻度が高いことを明らかにした一方、秋田県と愛知県で菌種分布に明瞭な違いがあることを示し、地域に特有の感染疫学が存在している可能性を指摘した。MDRA は確認されなかったものの *A. baumannii* には 5 剤以上の薬剤耐性を獲得した株が認められること、*A. baumannii* 以外のアシネトバクター属菌では比較的薬剤耐性株が少ないことを明らかにした。さらに、MLST 解析により愛知県には耐性傾向が強いといわれる European clone II が存在していることも示し、これまで殆ど明らかになってい

ない国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学の一端を明らかにすることができた。

今年度は、国立感染症研究所が全国の国立病院から収集した 998 株のアシネトバクター属菌疑い株について菌種同定を行った。また、*A. baumannii* の MLST 解析と次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解析データに基づいた *A. baumannii* International Clone II の系統樹解析を行い、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を集積した。さらに、次世代シーケンサーを使用して *A. baumannii* の薬剤耐性遺伝子を検索した。

## B. 研究方法

### 1. アシネトバクター属菌の菌種同定

国立感染症研究所が全国 78 の国立病院から収集した 998 株のアシネトバクター属菌疑い株を菌種同定に供した。菌種の同定は、Bernard La Scola らが報告(*J. Clin. Microbiol.*, Vol.44, p. 827–83, 2006)した *rpoB* 遺伝子の DNA シーケンス解析と、Jane F Turton らが報告(*J. Clin. Microbiol.*, Vol.44, p. 2974–2976, 2006)した *A. baumannii* に特異的 (Intrinsic) な OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法を併用して実施した。但し、*rpoB* 遺伝子の増幅には Ac696F と Ac1598R プライマーを使用し、シーケンスプライマーには Ac696F を使用した。PCR には EX Taq DNA Polymerase (Takara Bio)を使用し、シーケンス用テンプレートの精製には Illustra ExoProStar (GE Healthcare)を使用した。DNA シーケンスの決定はファスマック (株) に外注した。*rpoB* 遺伝子の増幅がみられなかった供試株については 16S リボゾーマル RNA のシーケンスにより菌種を確認した。

## 2 . *A. baumannii* の MLST 解析

愛知県で分離された *A. baumannii* 20 株と秋田県で分離され、調査した薬剤に何らかの耐性が認められた 18 株についてパスツール研究所

( [www.pasteur.fr/mlst](http://www.pasteur.fr/mlst) ) の方法に従い MLST 解析した。

## 3 .全ゲノム解析による系統樹解析と薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された 4 株の *A. baumannii* International Clone II と秋田県で分離された 3 株の *A. baumannii* International Clone II を供試し、次世代シーケンサーを使用して全ゲノム解析を行った。得られたデータと、国立感染症研究所で解析した MDRA 3 株のデータ、GenBank に登録された国内外の株のデータを併せて single nucleotide polymorphisms (SNP)による系統樹解析を行った。系統樹解析は MUMer (Genome Biology, 5:R12, 2004)を用いた SNP 抽出、FastTree (PLoS ONE, 5(3):e9490, 2010)による系統樹解析、MEGA5 (Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739, 2011)による系統樹描画の手順で行った。また、ResFinder 2.1 ( <http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/> )により薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。

## 4 . 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は KB 法により実施した。供試薬剤はセフォタキシム (CTX), セフトジジム (CAZ), イミペネム (IPM), メロペネム (MEPM), アズトレオナム (AZT), セフェピム (CFPM), ペラシリン (PIPC), アミカシン (AMK), シプロフロキサシン (CPFX), ミノサイクリン (MINO), コリスチン (CL), スルフイソキサゾール (G)とした。

## C. 研究結果

### 1 . アシネトバクター属菌の菌種同定

998 株のアシネトバクター属菌疑い株のうち、866 株がアシネトバクター属菌であった。これらの株の *rpoB* 遺伝子シーケンスに基づき作成した系統樹を図 1 に示した。*A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. sp. close to 13TU*, *A. pittii*, *A. calcoaceticus/oleivorans*, その他の菌種が系統樹上でそれぞれ同一のクラスターに分類されることが示され、*rpoB* 遺伝子のシーケンス解析がアシネトバクター属菌の同定に極めて有用であることが確認できた。一方、*rpoB* 遺伝子のシーケンスにより *A. baumannii* と同定された 645 株のうち、1 株以外は OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法が陽性となることが確認された。OXA51-like 遺伝子 PCR が陰性となった 1 株について OXA51-like 遺伝子のシーケンスを解析した結果、これらの株では OXA51-like 遺伝子に Insertion Sequence (IS)が挿入されていることが明らかとなった。

図 2 にアシネトバクター属菌 866 株の菌種を円グラフで示した。菌種は検出数が多い順に *A. baumannii* 645 株 (74%)、*A. nosocomialis* 84 株 (10%)、*A. pittii*, 60 株 (7%)、*A. sp. close to 13TU* 15 株 (2%) であった。データは示さないが、感染症法に規定する MDRA の報告基準に該当する *A. baumannii* は 645 株中 2 株のみであった。

### 2 . *A. baumannii* の MLST 解析

表 1 に愛知県で分離された *A. baumannii* 20 株と秋田県で分離された *A. baumannii* 18 株の MLST 解析の結果を示した。愛知県では 20 株中 9 株 (45%) が ST2、8 株が ST33 から ST235slv の 5 種類の MLST Type、3 株が既知 Type に該当しない MLST Type であったのに対

して、秋田県では 18 株中 17 株 (94%) が ST2、1 株のみが ST22 であり、両県とも International clone II がすでに分布していることが示された。

### 3 .全ゲノム解析による系統樹解析と薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された 4 株の *A. baumannii* International Clone II、秋田県で分離された 3 株の *A. baumannii* International Clone II、国立感染症研究所で解析した MDRA 3 株、そして国内外で報告されたデータを併せて作成した SNP 系統樹を図 3 に示した。国内で分離された *A. baumannii* International Clone II は愛知株、秋田株と共に同一のクラスターに分類され、これらが非常に近縁な株であることが明らかとなった。また、秋田県と、愛知県由来株は各県内由来株によるサブクラスターを形成していた。これに対して、国立感染症研究所で解析した MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに分類された。一方、海外で分離された株については、系統樹の外周に位置する多彩な距離に分類され、国内株とは遺伝的な隔たりが大きいことが示された。

供試した 7 株の *A. baumannii* の全ゲノム解析の結果検出された薬剤耐性遺伝子の一覧と、秋田株 3 株の KB 法による感受性試験の結果を表 2 に示した。7 剤に耐性を示す AC18 株と AC45 からはそれぞれ 12 種類と 8 種類、5 剤に耐性を示す AC34 からは 5 種類の耐性遺伝子が検出された。愛知株についても 7 種類から 12 種類の耐性遺伝子が検出された。アミカシン耐性を示した AC18 は、アミノグリコシド耐性に関与する *aadA1*、*aac(6')iB-cr*、*armA* 遺伝子を保有していた。*armA* 遺伝子は愛知株 4 株中 3 株にも検出されており、アミノグリコシドの

高度耐性に関与するこの *methylase* 遺伝子が国内の *A.baumannii* に侵淫していることが示された。

### D. 考察

医療機関の細菌検査室や民間検査機関ではアシネトバクター属菌の菌種同定が困難であることから、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学はその多くが不明である。今回、我々は国立感染症研究所が全国 78 の国立病院から収集したアシネトバクター属菌 866 株について菌種の同定を行い、国内の医療機関におけるアシネトバクター属菌の分離状況を明らかにした。その結果から、*A. baumannii* が 645 株 (74%) と最も多く、次いで *A. nosocomialis* 84 株 (10%)、*A. pittii*、60 株 (7%)、*A. sp. close to 13TU* 15 株 (2%) と続くことが示された。国内の医療機関で分離されるアシネトバクター属菌約 900 株弱について菌種を遺伝子レベルで決定した例はこれまでになく、今回我々が示した成績は国内初のデータとなる。

今回も昨年度同様、*rpoB* 遺伝子のシーケンス解析に基づきアシネトバクター属菌の同定を行った。その結果、同一菌種が系統樹上でそれぞれ同一のクラスターに分類されることが示され、*rpoB* 遺伝子のシーケンス解析がアシネトバクター属菌の同定に有用であることが改めて確認できた。866 株もの分離株を供試して *rpoB* 遺伝子の系統樹解析を実施した例も国内ではこれまでになく、今回我々が得た成績はアシネトバクター属菌の菌種同定法としての *rpoB* 遺伝子のシーケンス解析の有用性を示す貴重なデータといえる。同様に、OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法が *A.baumannii* の同定法として有用であることも示し得たが、OXA51-like 遺伝子に IS が挿入されたこ

とにより、OXA51-like 遺伝子 PCR が偽陰性となる *A.baumannii* が少数ではあるが存在することが確認された。このような株では IS の挿入位置と IS のサイズにもよるが、OXA51-like 遺伝子 PCR において設計サイズよりも大きなエキストラバンド様の増幅断片が検出される可能性も考えられ、そのような分離株に遭遇した場合には *rpoB* 遺伝子のシーケンスを行うことにより *A.baumannii* の確認が必要と考えられる。

昨年度、我々は秋田県と愛知県で分離株の菌種分布に明瞭な違いがあることを示し、アシネトバクター属菌においては地域に特異的な感染疫学が成立している可能性を指摘した。今回 SNP 系統樹解析により秋田県と愛知県の株は非常に近縁であることを示したが、さらに詳しく見ると、秋田県と愛知県由来株は各県内由来株で小さなサブクラスターを形成していた。この結果は、昨年指摘したアシネトバクター属菌全般についてのみならず、*A. baumannii* International Clone II についても地域に特異的な感染疫学が成立している可能性を示唆するものとして興味深い。

一方、SNP 系統樹解析により、国内で分離された *A. baumannii* International Clone II は非常に近縁な株であること、また、国内で分離された MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに属することが示された。このことは、国内に侵淫している *A. baumannii* International Clone II の中で MDRA が他のクラスターに属する株と異なる起源と感染疫学を持つ可能性を示唆することとして興味を持たれる。

今回、我々が検討した範囲では、*A. baumannii*645 株中 MDRA に該当する株は 2 株のみであった。このことは、諸外

国とは異なり、国内には MDRA が未だに殆ど侵淫していないことを示すものと考えられ、現時点では国内における MDRA による院内感染発生リスクは大きくはないものと推察される。しかしながら、国内においては MDRA による深刻な院内感染がこれまで実際に発生していることから、MDRA の感染予防策を構築することは重要である。MDRA については国内における分離数が少ないことにより解析データも少なく、感染予防策の構築に重要な知見が非常に乏しい。そのため、今後、国内における MDRA について更に広範囲・長期間にわたる調査を行い、感染疫学に関するデータを集積することが重要と考えられる。

多剤耐性菌の耐性遺伝子を特定することは、従来、極めて困難であった。今回、我々は次世代シーケンサーによる全ゲノム解析とオンラインサーチサイトを併用することにより耐性 *A.baumannii* の耐性遺伝子の検索を試行した。その結果、供試した株により 5 種類から 12 種類の薬剤耐性遺伝子が特定された。このような耐性遺伝子の検索は、次世代シーケンサーを使用する以前の、従来の方法では実現不可能であった。但し、この方法ではキノロン耐性やマクロライド耐性の機構として重要である標的遺伝子の SNP 変異による耐性機構を特定することはできない。しかしながら、次世代シーケンサーとオンラインサーチサイトを併用して薬剤耐性遺伝子を検索する方法は、薬剤耐性機構の解明に極めて有効であり、他の菌種の薬剤耐性機構の研究にも広く応用可能であると考えられる。

アミカシン耐性を示した AC18 は、アミノグリコシド耐性に関与する *aadA1*、

*aac(6)*iB-cr、*armA* 遺伝子を保有することが示された。これらの遺伝子のうち、*armA* 遺伝子はアミノグリコシドの高度耐性に関与する methylase 遺伝子の一種であり、AC18 株のアミノグリコシド耐性機構で重要な役割を果たしているものと推定された。また、AC18 株は *sul1* 遺伝子を保有し、スルファメトキサゾールにも耐性を示したことから、Class 1 Integron を保有する可能性が高いものと考えられ、Class1 Integron の特定と構造解析が今後の課題となる。

今回解析に供した株はいずれもイミペネム感受性であり、MDRA の報告基準は満たしていない。イミペネムにも耐性を獲得した MDRA のイミペネム耐性機構の詳細について興味を持たれる。

#### E. 結論

886 株のアシネトバクター属菌を供試して実施した今年度の研究により、*rpoB* 遺伝子の解析はアシネトバクター属菌の同定に有用であることが改めて確認された。OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法が *A.baumannii* の同定法として有用であ

ることも同時に確認されたが、IS の挿入による偽陰性の可能性について考慮する必要がある。次世代シーケンサーによる全ゲノム解析は *A.baumannii* の SNP 解析による分子疫学解析に有用であるのみならず、従来は困難であった薬剤耐性遺伝子の検索にも極めて有用であることが示されたことから、今後もこの方法を応用してアシネトバクターの耐性機構の解明に取り組む必要がある。

国内において MDRA は稀であり、侵淫は深刻な状況には至っていないと考えられるが、院内感染防止策構築の基礎となる MDRA の感染疫学に関して、さらなる調査が必要である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし