

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 *Acinetobacter baumannii* 国際流行株の鑑別法の開発

分担研究者 荒川 宜親（名古屋大学 分子病原細菌学 / 耐性菌制御学）
研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）

研究要旨

多剤耐性傾向の強い *Acinetobacter baumannii* の世界流行クローンである、international clone I (ICI) および II (IC II) を PCR のみで鑑別する PCR-based ORF typing (POT) 法の開発を目的とした。アシネトバクター属菌の全ゲノムデータ比較によって、IC I 及び IC II の鑑別を行うための 7 個の ORF、*A. baumannii* マーカーとして OXA-51、さらに *A. pittii*、*A. nosocomialis* および *Acinetobacter* sp. close to *A. nosocomialis* のそれぞれの菌種に特異的な ORF、及びアシネトバクター属菌マーカーを選び出し、12-plex PCR によって検出することとした。今回開発した POT 法を用いることで、臨床分離されたアシネトバクター属菌から簡便かつ迅速に世界流行クローンを鑑別することが可能となり、日本における多剤耐性アシネトバクターの蔓延を防止する上で大きく貢献できるものと考えられる。

A. 研究目的

アシネトバクター属菌は、近年、病院で院内感染の原因として問題となっている病原細菌である。特に、*Acinetobacter baumannii* では、カルバペネム、アミノ配糖体、ニューキノロンに広範な耐性を獲得した多剤耐性株の増加と蔓延が問題となっており、重要な感染制御の対象菌種となっている。欧州や米国の医療機関では、多剤耐性を獲得した *A. baumannii* が増加し大きな問題となっている。しかし、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業の集計によれば、国内の主要な病院で分離される多剤耐性アシネトバクターの割合は、1%以下であり、我が国ではこの状態を今後も維持する必要がある。以上のことから、多剤耐性を獲得した *A. baumannii* の国内の医療機関での増加や蔓延を防止するため、本耐性菌を早期に検出することが重要となっている。多剤耐性アシネトバクターは multilocus

sequence typing (MLST) によって特定のクローンが蔓延していることが明らかになっており、international clone I (Pasteur ST1 または Bartual CC109) および international clone II (Pasteur ST2 または Bartual CC92) が主要な多剤耐性クローンである。しかし、医療機関の一般医的な細菌検査室や検査センターなどでは、シーケンス解析による *A. baumannii* およびその流行株を正確に同定、識別することが困難である。そこで PCR のみで *A. baumannii* およびその流行株を正確に同定、識別可能な方法、すなわち PCR-based ORF typing (POT) 法の開発を行った。

B. 研究方法

A. baumannii 全ゲノムデータ [AB0057 (AN: CP001182), AB307-0294 (AN: CP001172), AYE (AN: CU459141), ACICU (AN: CP000863), ATCC17978 (AN: CP000521), SDF (AN: CU468230) (AN:

アクセッション番号)]を比較し、菌株毎に保湯状態の異なる ORF を抽出し、POT 法開発の候補 ORF とした。臨床分離株における候補 ORF 保有パターンを PCR で調査し、POT 法に採用する ORF の選定を行った。

また、生化学性状による同定の困難な *Acinetobacter calcoaceticus* – *baumannii* complex の菌種を鑑別するために、*A. pittii* (D499, AN: AGFH00000000; DSM9306, AN: AIEF00000000; DSM21653, AN: AIEK00000000; SH024, AN: NZ_ADCH00000000), *A. nosocomialis* (NCTC8102, AN: AIEJ00000000 and RUH2624, AN: NZ_ACQF00000000), *A. calcoaceticus* (PHEA-2, AN: CP002177; DSM30006, AN: NZ_APQI00000000; RUH2202, AN: NZ_ACPK00000000), *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis* (GG2, AN: ALOW00000000) ゲノムデータの比較を行い、種特異的な ORF の選別を行った。

81 株の *A. baumannii* 臨床分離株を新たに開発した POT 法によってタイピングし、その結果を MLST 解析(Pasteur)と比較した。

C. 研究結果 (表 1)

7 個の ORF の保有パターンによって国際流行株の鑑別ならびにその他のクローンの大別を行う事ができた。また、臨床分離されることが多い *A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis* および *Acinetobacter* sp. close to *A. nosocomialis* の 4 菌種のマーカーとなる ORF を見いだすことができた。上記 11 個の ORF にアシネトバクター属菌マーカーを加えた 12 個の ORF を 1 反応系列の multiplex-PCR で増幅、電気泳動によって ORF 保有パターンを確認する系を確立できた。

81 株の *A. baumannii* 臨床分離株を POT

法と MLST 法でタイピングしたところ、international clone I と II はそれぞれに固有のパターンとなり他のクローンから鑑別できた。international clone I と II の ORF 保有パターンはその他のクローンとは少なくとも ORF 2 個以上の違いがあった。その他の株は 18 clonal complex に分類されたが、POT 法では 17 種類に分類できた。

またアシネトバクター属菌の菌種マーカーはそれぞれの菌種に特異的であった。しかし *A. pittii* では感度がやや悪く約 95%であった。

D. 考察

今回開発した POT 法は PCR のみで *A. baumannii* 国際流行株を選別することができた。本法の活用によって臨床上問題となりやすい株を効率よく選別できることから、*A. baumannii* の耐性菌蔓延防止に役立つと期待される。また本法は世界流行株の選別ができるのみならず、MLST に近い結果が得られるため、新たな薬剤耐性クローンが出現した場合にも鑑別できる可能性があり、広範囲なクローンの鑑別に利用可能と期待される。

POT 法によるタイピング結果は MLST 解析との相関関係が見られ、黄色ブドウ球菌や緑膿菌と同様の傾向であった。多くの菌種で ORF 保有パターンによる MLST 型の推定が可能かもしれない。今後、PCR による容易な菌株のタイピング法が普及することによって、通常の細菌検査室においても分子疫学解析が可能となることが期待される。

E. 結論

今回開発した POT 法を用いることで臨床分離されたアシネトバクター属菌から簡便かつ迅速に世界流行クローンを鑑別することが可能となり、日本における

多剤耐性アシネトバクターの蔓延を防止する上で大きく貢献できるものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

Suzuki M, Hosoba E, Matsui M, Arakawa Y. New PCR-based open reading frame typing method for easy, rapid, and reliable identification of *Acinetobacter baumannii* international epidemic clones without performing multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2014 52: 2925-32.

学会発表

1) 鈴木匡弘他、*Acinetobacter baumannii*

国際流行株の鑑別法の開発、第 42 回薬剤耐性菌研究会 2013 年 10 月、熱海市

2) 鈴木匡弘、荒川宜親 細菌検査室で実施可能な *Acinetobacter baumannii* 国際流行株の鑑別法の開発と臨床応用、第 60 回臨床検査医学会、2013 年 11 月 神戸市

3) 鈴木匡弘他、*Acinetobacter baumannii* 国際流行株の鑑別法の開発、第 25 回日本臨床微生物学会、2014 年 2 月 名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2014-61751 / PCT/JP2014/058236 アシネトバクター属菌の遺伝型タイピング法及びこれに用いるプライマーセット

表1 POT 法に採用した ORF の保有パターンと MLST との関係

POT number	ST (CC or allele profile)	Number of isolates	ORF											
			<i>Acinetobacter</i> specific	OXA 51	<i>A. pittii</i> specific	<i>A. nosocomialis</i> specific	<i>A</i> sp-specific	AB57_2484	ACICU_02042	ACICU_02966	ACICU_01870	AB57_3308	ACICU_03137	AB57_0815
<i>A. baumannii</i>														
122	ST2 (CC2)	27	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
69	ST1 (CC1)	3	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
0	ST235 (CC33)	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	ST33 (CC33)	18	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8	ST148	1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
32	CC33 (3-5-7-1-12-1-2)	2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
32	ST239 (CC216)	1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
44	new (1-4-2-1-42-1-4)	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
44	ST40	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
10	ST52	1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
40	CC10 (1-3-2-1-4-1-4)	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
41	ST49	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
56	ST142	1	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
72	ST152	4	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
73	ST212	1	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
92	ST246	1	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
96	CC216 (3-4-2-2-7-2-2)	1	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
104	ST34 (CC34)	9	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
104	new (27-2v-2v-1-9-2-5)	3	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
104	ST145 (CC216)	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-

106	CC109 (3-4-2-2-9-1-5)	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	
108	ST133	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	
<i>A. pittii</i>															
66	NA ^a	9	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
70	NA ^a	1	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	
74	NA ^a	2	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	
74	NA ^a	1	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	
76	NA ^a	1	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	
78	NA ^a	6	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	
<i>A. nosocomialis</i>															
97	NA ^a	1	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	
104	NA ^a	26	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	
105	NA ^a	49	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	
105	NA ^a	1	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	
<i>A. species close to A. nosocomialis</i>															
41	NA ^a	7	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	
105	NA ^a	4	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	
109	NA ^a	2	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
125	NA ^a	2	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	

^a Not adopted.