

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
分担課題

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鑑別法に関する研究」

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）
研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所）
研究協力者 清水美和子（富山県衛生研究所）
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）

研究要旨

Acinetobacter 属菌、特に *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex (ACBC) を構成する 4 つの *genospecies* (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*) を迅速に鑑別する遺伝子検査法を検討した。昨年度は、*rpoB* 遺伝子を対象とした MultiplexPCR 法を考案し、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* を鑑別することが可能となったことを報告した。今年度は、この方法の有用性を評価するため、引き続き県内医療機関から分離された ACBC 40 株について検討した。また、本鑑別法の客観的な評価を得るため他の研究機関への評価を依頼し、28 株の ACBC を用いて検討した。その結果、ACBC 構成菌種の鑑別能は *rpoB* 配列による系統解析結果とよく一致した。従って、実用レベルの鑑別法として使用できると思われる。

A. 研究目的

地方衛生研究所（地研）は、公衆衛生領域で発生する様々な健康危機事例に際し、検査を通じて科学的エビデンスを提供し、健康危機事例の早期探知や拡大防止に資することを目的の一つとする。従って、近年問題となりつつある医療関連機関における薬剤耐性菌の広がりに対して、地研の役割が期待されるなかで、検査機能の強化が望まれている。

アシネトバクター属菌は、ブドウ糖非発酵グラム陰性短桿菌で、ヒトに病原性を示す菌種としては *Acinetobacter baumannii* がよく知られている。さらに、ヒトに対して感染症を起こす可能性がある *A. calcoaceticus*, *A. genospecies 13TU* (以下、*A. nosocomialis*)、*A. genospecies 3* (以下、*A. pittii*) とは、ほぼ同様な生化学的性状を示すため、医療機関等で汎用されている自動同定機器や一般の検査法では

正しく鑑別することは難しく、そのため *A. calcoaceticus-baumannii* complex (ACBC) と呼ばれている。さらに、アシネトバクター属菌は高い形質転換能をもち外来遺伝子を取り込むシステムを有していることに関連して、*A. baumannii* の多剤耐性化と医療機関でしばしば検出される *A. nosocomialis* や *A. pittii* との関連性など不明な点が多いのも事実である。アシネトバクター属菌は、医療機関内で院内感染や日和見感染を起こすことが知られており、特に *A. baumannii* は多剤耐性化しやすく、しばしば集団発生による死亡例も報告されている。このような中で 2011 年 1 月、薬剤耐性アシネトバクターは感染症法の 5 類感染症(定点)に追加され、また、2014 年 9 月には全数報告対象感染症となり、報告基準が設けられた。従って、*A. baumannii* の院内対策をするうえで、アシネトバクター属菌の分離状況を把握することは重要である。

それには、ACBC 構成菌種を簡便に鑑別する方法が必要である。

アシネトバクター属菌は、DNA-DNA 分子交雑法で区別された遺伝子型 (genospecies) で歴史的には分類されており、ACBC は生化学的性状での鑑別が難しいため、遺伝子型による簡便な鑑別法が利用されている。例えば bla_{OXA51-like} を検出するアシネトバクター属菌は、*A. baumannii* とほぼ判定できる。しかし、この方法は極めて簡便ではあるが、細菌の鑑別法としての意味づけは不明である。また、16SrRNA 配列による分類も DNA-DNA 分子交雑法による分類には及ばず、極めて近縁な細菌の鑑別法として、蛋白質をコードしている遺伝子配列の多型を利用した鑑別法が開発されており、その対象遺伝子は、*recA*, *gyrB*, *rpoB* などがよく利用される。

本研究では、ACBC を構成する上記 4 つの菌種を迅速に鑑別することを可能にする PCR ベースの方法を開発することを目的とし、当初は *gyrB* 配列を対象とし、その後アシネトバクター属菌の鑑別に有効であるとされる *rpoB* の配列多型を複数のプライマーで検出する Multiplex PCR 法を考案し、その鑑別能について昨年度、その有用性について報告した。最終年度の今年度は、さらに検討数を増やすことと、他の研究機関で本鑑別法の評価を依頼したのでその結果について報告する。

B. 研究方法

B-1 供試菌株および供試 DNA

富山県内の医療機関で分離され、自動細菌同定検査装置等で同定された *Acinetobacter* 属菌 42 株のうち、生育しなかった 2 株を除いた 40 株 (AcT071~078, 080~111) を対象とした (表 1)。また、愛媛県内で分離された同じく *Acinetobacter* 属菌 28 株 (E01~28) を本鑑別法の評価のために用いた (表 2)。

B-2. 培養と DNA 抽出

トリプチケースソイ寒天培地で生育させた新鮮コロニーの一部を 100 μL 5% (W/V) キレックス 100 に懸濁し、100 10 分間処理を行い、遠心上清を分取し、TE 緩衝液を用いて 50ng/μL 濃度に希釈し、PCR の鋳型とした。保管は、凍結保管とした。

B-3. 感受性試験

富山県の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌の薬剤感受性試験は、センシディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用い、判定はディスクの判定法に従った。使用した 12 ディスクは以下の通りである: 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), ピペラシリン (PIPC), アミカシン (AMK), シプロフロキサシン (CPF), ミノサイクリン (MINO), コリスチン (CL), スルフィソキサゾール (G.25)。

B-4. PCR と DNA sequencing

供試菌株から抽出した DNA を用いた PCR は、bla_{OXA51-like}、bla_{OXA23-like} 及び integron マーカーである integrase 遺伝子を検出するプライマーを用いて実施した (プライマー配列等、昨年の報告書に記載)。PCR は、QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Inc.) を用いて、増幅産物は、1.5% アガロース S (ニッポンジーン) で電気泳動し、臭化エチジウムで染色、脱色後、写真撮影した。

ACBC 鑑別 PCR は、KODFX (Toyobo) を使用し、プライマーセットは MC-6/MD-6 を用いた (図 1)。増幅産物の検出は、2% NuSieve®3:1 Agarose (Takara) で電気泳動し、臭化エチジウムで染色、脱色後、写真撮影した。

rpoB の部分配列決定は、昨年度の報告と同様、La Scola らの報告 (J.Clin.Microbiol., 44:827-832, 2006) を参照して、*rpoB* 内の Zone1 及び Zone2 の

配列解析を行った。配列決定用の鋳型調製は、PCR 後、増幅物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、これを鋳型として、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit Ver3.1 を用いて解析した。得られたデータは、Sequencher[®] で塩基配列の品質チェック、トリミング後、Web ベースの Blast 検索を実施し、菌種を推定し、*rpoB* 塩基配列による鑑別結果とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者情報を切り離れた臨床分離株のみを用いているため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

C-1. 富山県内の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌を用いた PCR 鑑別結果

今年度、富山県の医療機関に協力を依頼し、アシネトバクター属菌の収集した 40 株を用いて、MC-6/MD-6 混合プライマーを用いた PCR を実施した。供試した 40 株の薬剤感受性試験、PCR による遺伝子保有状況、及び *rpoB* 配列による菌種の同定結果を示した(表 1)。

先ず、感受性試験の結果であるが、すべての株でカルバペネム(IPM,MEPM)に感性、ニューキノロン(CPFX)には 39 株が感性で、1 株のみ耐性を示していた。また、21 株がアズトレオナム(AZT)に耐性を示した。この 40 株について、*rpoB* 配列から同定された株の分離頻度は、*A. baumannii*, 20/40(50%); *A. nosocomialis*, 4/40 (10%); *A. pittii*, 8/40 (20%); *A. spp.*, 8/40 (10%)であり、*A. spp* 株の内訳は、*A. soli*, 2/40 (5%)で、残りは *A. guilloulae*, *A. ursingii*, *A. guillouiae*, *A. haemolyticus* が一株ずつで、残りの 3 株については、*A. spp* のままであった(図 2、表 1)。

rpoB 配列の同定結果と PCR での鑑別結果を比較すると、ACBC に限定した結果を示す

と、*A. baumannii*, *A. nosocomialis* については、完全に一致していた。しかし、8 株のうち 2 株の *A. pittii* は、PCR では明確に *A. pittii* とは判断できなかった。また、今年度、*A. calcoaceticus* は、分離されなかった。

ここで、*rpoB* 配列で *A. pittii* と判定し、PCR では *A. spp* と判定された 2 株 (AcT082 及び AcT092) について検査結果を見てみると(図 3) ここでは、AcT092 の例のみを示したが、典型的な *A. pittii* では、反応 B で、約 700bps と 130bps に増幅産物が検出される(AcT091)が、AcT092 では、反応 A に 130bps 付近に増幅物が検出されるが、700bp 付近に増幅物が検出されず、典型的な *A. pittii* のパターンとは異なるものであった。また、*rpoB* 配列の Blast 検索を行ったところ、AcT091 と AcT092 は、結果は同一でなかった(図 3)。

C-2. 愛媛県内の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌を用いた PCR 鑑別結果

愛媛県内で分離された *Acinetobacter* 属菌 28 株を用いて、本鑑別法で評価した。

先ず、感受性試験の結果であるが、カルバペネム(MEPM)に耐性、ニューキノロン(CPFX)に耐性株が 1 株検出された。この株は、その他 CTX,CAZ,AZT,CFPM,PIPC,G.25 に耐性を示した。残りの 27 株はほとんどの薬剤に対して感性であった。

この 28 株について、*rpoB* 配列から同定された株の分離頻度は、*A. baumannii*, 19/28 (68%); *A. nosocomialis*, 1/28 (3.6%); *A. pittii*, 4/28 (14%); *A. spp.*, 4/28 (14%)であり、*A. spp* 株の内訳は、*A. soli*, 2/28 (7.1%)と *Acinetobacter* GS13B と *A. haemolyticus* が一株ずつであった(図 4、表 2)。

rpoB 配列の同定結果と PCR での鑑別結果を ACBC に限定して比較すると *A. baumannii*, *A. nosocomialis* 及び *A. pittii* については、完全に一致していた。

D. 考察

A. baumannii 以外で市中感染及び医療関連感染の原因としてこれまで報告があるのは、*A. lwoffii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. ursingii*, *A. johnsonii* や *A. soli* 等である。しかし、*A. baumannii* 以外で多いのは、ACBC であり、ACBC に含まれる *A. calcoaceticus* はほとんど医療機関から分離されないことから、医療機関で鑑別の必要な菌種は、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* である。

そこで、*rpoB* 配列を用いると *Acinetobacter* 属菌が鑑別できることを利用して、塩基配列決定を行わないで同定できる方法を検討した。その結果、昨年度の報告書において、*rpoB* を対象とした Multiplex PCR 法を開発し、その型別能力を検討したところ、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* について、迅速な鑑別が可能であることを示した。今年度はさらにこの方法を評価するため、富山県と愛媛県で分離された株で評価した。その結果、*rpoB* 配列結果と PCR の結果はほぼ相関することが確認された。

今年度の検査結果から、*rpoB* 配列では *A. pittii* であったが、PCR 法では *A. spp* となった 2 株が検出された。しかし、この結果をよく検討すると、非典型的な *A. pittii* であることが分かった (図 3)。*rpoB* 配列の Blast 検索の結果から、典型的な *A. pittii* の配列とは異なっており、*A. spp* と判定が正解と思われた。この株は、*A. pittii* の variant 株の可能性があるが、これを明らかにするためにはさらに解析が必要である。

また、*Acinetobacter* 属菌の分離割合をみると、富山県では本年の解析数 40 株と昨年の解析株の合計 109 株のうち、*A. baumannii* は、41.3%で、ほとんどの薬剤に感性であり、現在、薬剤耐性となりやすいとされる *A. baumannii* 内の遺伝系統と知られている international clone II (ICII) は、含まれていない可能性がある(未実施)。別の全国調査によると *A. baumannii* の分離

率は 74%であるとされており、また愛媛県ではニューキノロンとカルバペネム耐性株が一株分離されているが、*A. baumannii* の分離率は 68%であった。このことから、*A. baumannii* の分離率が高いほど、高度な薬剤耐性菌とされる ICII の系統が入り込んでいることが示唆される。今後、更なる調査が必要である。

E. 結論

ACBC 構成アシネトバクター属菌を PCR で鑑別する実用的な方法を開発し、その有用性を評価した。

今回、開発した ACBC 構成菌種の鑑別法は、医療機関で分離される、*A. calcoaceticus* 以外の 3 種が対象である。わずかに非典型株の存在のため、*rpoB* 配列の解析が必要となる場合もあるが、今回の鑑別法は、迅速な方法として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 綿引正則、清水美和子、金谷潤一、木全恵子、磯部順子、松井真理、鈴木匡弘、荒川宜親、柴山恵吾、佐多徹太郎。*A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex (ACBC) の PCR による同定法開発の試み。第 88 回日本感染症学会学術講演会、平成 26 年 6 月 18 日 ~ 20 日 (福岡市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 謝辞

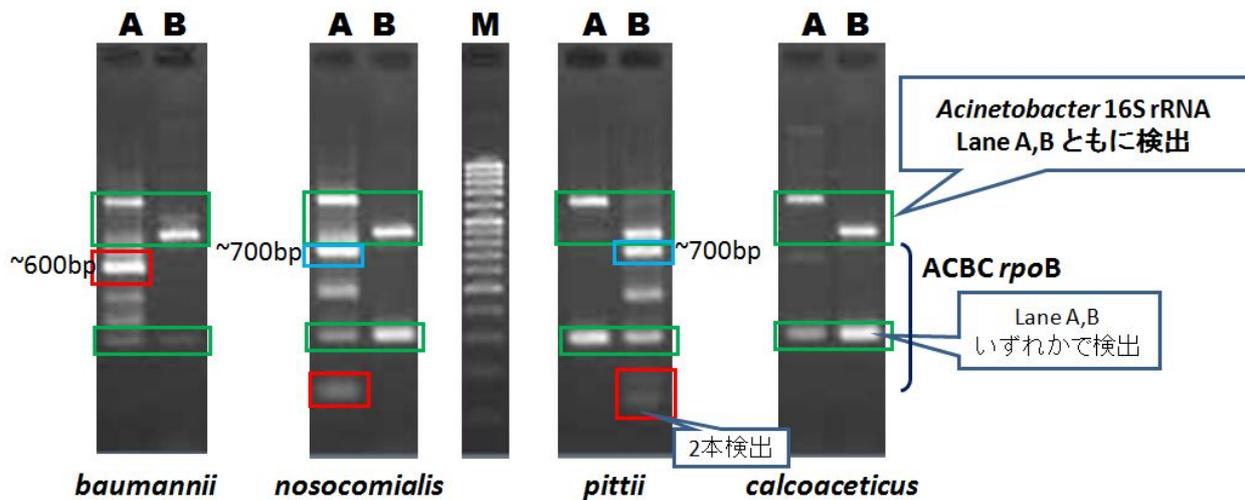
愛媛県立衛生環境研究所・微生物試験室の仙波敬子先生には、今回開発した検査法について、評価試験にご協力を頂きました。

ここに感謝の意を表します。

MC-6/MD-6を用いたACBC構成4菌種の鑑別点:まとめ

Lane A: preference reaction for *A. baumannii* or *nosocomialis*

Lane B: preference reaction for *A. pittii* or *calcoaceticus*



本法のPCRは、KODFX(Toyobo)を使用

7

鑑別点：

PCR (lane) A 及び B とともに 16S rRNA 由来の増幅サイズが異なる増幅物が検出されること。

A. baumannii と *A. nosocomialis* は、PCR (lane) A の増幅物で以下のとおり、判定する。

- ・ 600bp が検出されれば、*A. baumannii* と判定
- ・ 700bp と 130bp 付近に増幅物があれば、*A. nosocomialis* と判定

A. pittii は、PCR (lane) B の増幅物の有無で判定する。

- ・ 700bp と 130bp 付近に増幅物があれば、*A. pittii* と判定
- ・ *A. calcoaceticus* は、今のところ判定できない。

図1 . MC-6/MD-6 プライマーセットを用いた ACBD 構成 4 菌種の鑑別点

平成25-26年度 医療機関分離ACBC 109株の同定結果(富山県)

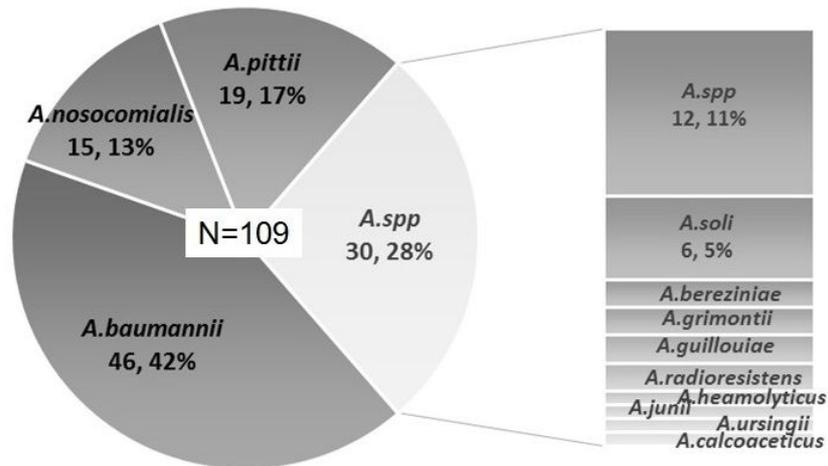
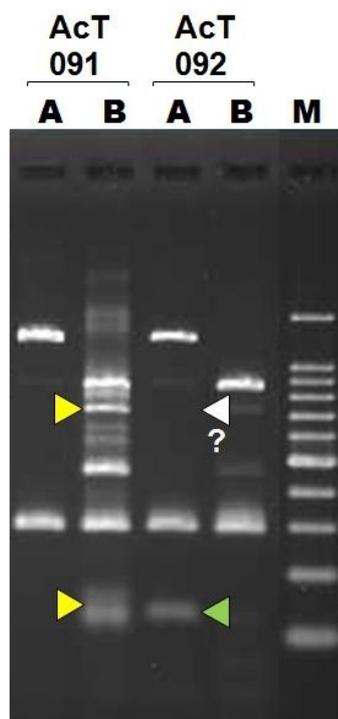


図2 . 平成 25-26 年に富山県の医療機関から分離された ACBC 株の同定結果

PCR判定とrpoB配列の不一致例 (AcT082, 092)



rpoB PCRの判定

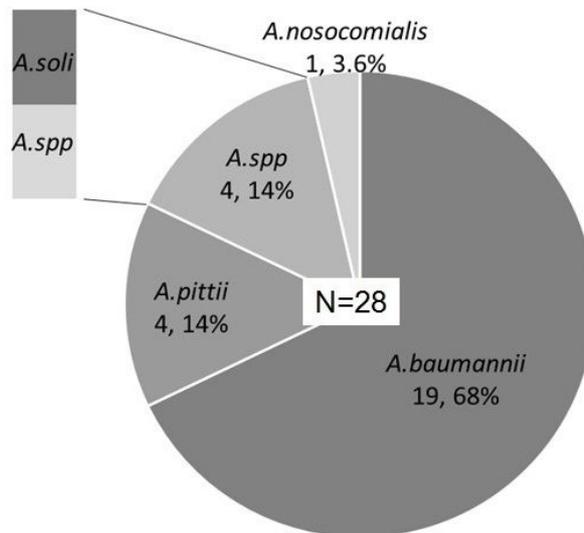
AcT091: 典型的なpittiiパターン
rpoB 配列も pittii と一致
AcT-92: 非典型nosocomialis?
rpoB配列はpittiiにヒット

rpoB sequenceとのblast結果

AcT091: Identities=861/861(100%)
pittiiと一致
AcT092: Identities=842/867(97%)
pittiiと判定

- 配列の多型を検出: PCRの限界

図3 . PCR 判定と rpoB 配列解析による鑑別結果の不一致例



- baumanniiの分離率は、68%と全国データ（74%）に近い。
- 二剤耐性（MEPM&CPFX）のbaumanniiが1株分離されている。

図4 . 平成26年に愛媛県の医療機関から分離されたACBC株の同定結果

表1

平成26年度 医療機関分離ACBC 40株の同定結果(富山県)

菌株ID	使用薬剤ディスク												OXA51遺伝子		rpoB遺伝子	
	CTX	CAZ	IPM	MEPM	AZT	CFPM	PIPC	AMK	CPFX	MINO	CL	G.25	PCR	PCR	sequencing	
Act070																
	no growth															
Act071	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act072	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act073	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act074	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act075	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp	
Act076	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp	
Act077	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act078	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act079																
	no growth															
Act080	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.soli	
Act081	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act082	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.pittii	
Act083	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act084	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act085	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.guillouiae	
Act086	I	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.ursingii	
Act087	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act088	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis	
Act089	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act090	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis	
Act091	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
Act092	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.pittii	
Act093	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act094	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act095	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act096	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act097	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
Act098	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act099	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act100	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act101	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
Act102	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
Act103	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp	
Act104	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis	
Act105	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis	
Act106	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act107	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
Act108	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
Act109	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.soli	
Act110	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
Act111	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	-	A.spp	A.heamolyticus	

表2

平成26年度 医療機関分離ACBC 28株の同定結果(愛媛県)

菌株ID	使用薬剤ディスク												OXA51遺伝子		rpoB遺伝子	
	CTX	CAZ	IPM	MEPM	AZT	CFPM	PIPC	AMK	CPFX	MINO	CL	G.25	PCR	PCR	sequencing	
E01	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E02	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E03	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E04	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.soli	
E05	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E06	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E07	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E08	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.soli	
E09	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E10	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E11	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E12	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E13	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E14	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	-	A.nosocomialis	A.nosocomialis	
E15	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E16	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
E17	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.spp	A.spp	
E18	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E20	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E21	I	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E22	R	R	S	R	R	R	R	S	R	I	S	R	+	A.baumannii	A.baumannii	
E23	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
E24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
E26	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	A.pittii	A.pittii	
E27	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	+	A.baumannii	A.baumannii	
E28	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	-	A.spp	A.GS13B	