

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 研究協力報告書「アシネトバクター属菌の感染疫学解明に関する研究」

研究分担者 佐多徹太郎（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）
研究協力者 綿引 正則（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、国立感染症研究所と連携し、全国の国立病院から収集した 866 株のアシネトバクター属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 SNP 系統樹解析と *A. baumannii* の薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。866 株中 *A. baumannii* が最も多く(74%)、次いで *A. nosocomialis* (10%)、*A. pittii* (7%)、*A. sp. close to 13TU* (2%)が続いた。MLST 解析の結果から、*A. baumannii* 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。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名が多剤耐性アシネトバクターに感染し、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、国内では多剤耐性アシネトバクターによる、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24年度から実施した。研究初年度である24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International clone II (IC 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。

25年度は国立感染症研究所と連携し、全国の国立病院から収集した約1000株

のアシネトバクター属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* IC 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、26年度において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

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リボゾーム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*A.*

baumannii 18 株についてパスツール研究所 (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 9 株および秋田県で分離された 8 株の *A. baumannii* IC II を供試し、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) を使用して全ゲノム解析を行った。得られたデータと、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 MUMmer (Genome Biology, 5:R12, 2004) を用いた SNP 抽出、RAxML (Bioinformatics, btu033, 2014) による系統樹解析、MEGA6 (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。供試薬剤はセフトキシム (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), スルフィソキサゾール (G) とした。

C. 研究結果

1 . アシネトバクテリア属菌の菌種同定

998 株のアシネトバクテリア属菌疑い株のうち、866 株がアシネトバクテリア属菌

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テリア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 にアシネトバクテリア属菌 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%) については ST2、8 株については ST33 等の 5 種類の MLST Type、3 株については既知 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 IC 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 9 株の *A. baumannii* International Clone II、秋田県で分離された 8 株の *A. baumannii* IC II、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* IC 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、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ることが明らかとなった。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。

全ゲノム解析に供試した 17 株の *A. baumannii* の KB 法による感受性試験結果 (表 2) と薬剤耐性遺伝子の一覧 (表 3) を示した。全ての分離株が CTX、CAZ、PIPC、CPFX 耐性であった。また、愛知県で分離された 11H01 株は CL を除く 11 剤に耐性を示し、多剤耐性アシネトバクターであった。この株は OXA-23 を保有していた。ResFinder による検索では OXA-51like (OXA-66, OXA-83) も含め 5~14 種類の薬剤耐性遺伝子が検出された。アミカシン耐性を示した 11 株は全て、アミノグリコシド耐性に関与する *armA* 遺伝子を保有し、他にも *aadA1*、*aac(6')Ib* などが見いだされた。*armA* 遺伝子はアミノグリコシドの高度耐性に関与するとされるが、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と連携し、78 国立病院で分離され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に関するデータを得た。その結果、*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検討して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* シークエンスを行うことにより *A. baumannii* の確認が可能であると考えられる。

一方、SNP 系統樹解析により国内で分離された *A. baumannii* IC II は非常に近縁な株であること、一方、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* IC 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。

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* IC 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。

国内においては MDRA による深刻な院内感染がこれまで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。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。供試した株により 5 種類から 14 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追うよう可能であると考えられる。

アミカシン耐性を示した 11 株は、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、11 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、秋田県で分離され

た4株を除き、*sul1* または *sul2* 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る。今回解析に供した株の大部分は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。OXA-23 保有の1株だけがイミペネムにも耐性を獲得しており、OXA-23 を保有した場合イミペネム耐性にはなることが示唆された。

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

- 1) 細羽恵理子、鈴木匡弘、国内で分離された *Acinetobacter baumannii* の MLST による系統解析、第 25 回日本臨床微生物学会(2014年2月)名古屋市
- 2) 鈴木匡弘、他、国内分離された *Acinetobacter baumannii* international clone II の全ゲノムによる系統解析、第 88 回日本感染症学会(2014年6月)福岡市
- 3) 全ゲノム解析による *Acinetobacter baumannii* 分子疫学解析の検討、第 88 回細菌学会(2015年3月予定)岐阜市

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1 *rpoB*遺伝子系統樹による*Acinetobacter*属菌同定結果

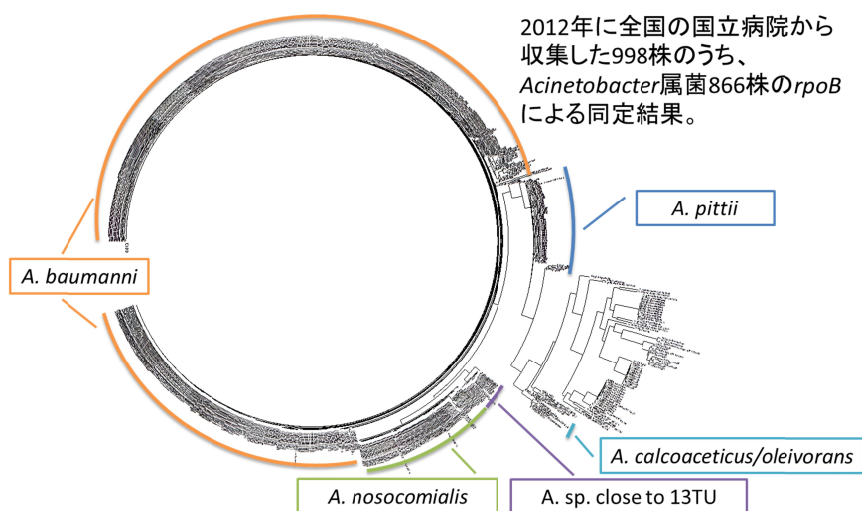


図2 *Acinetobacter* 属菌866株の同定結果

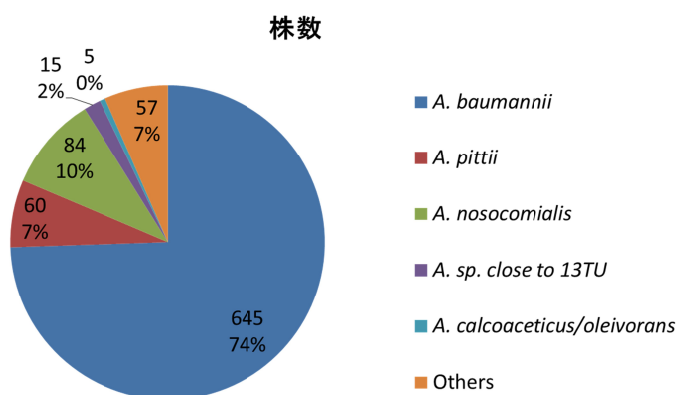


図3 全ゲノム SNP による系統樹解析

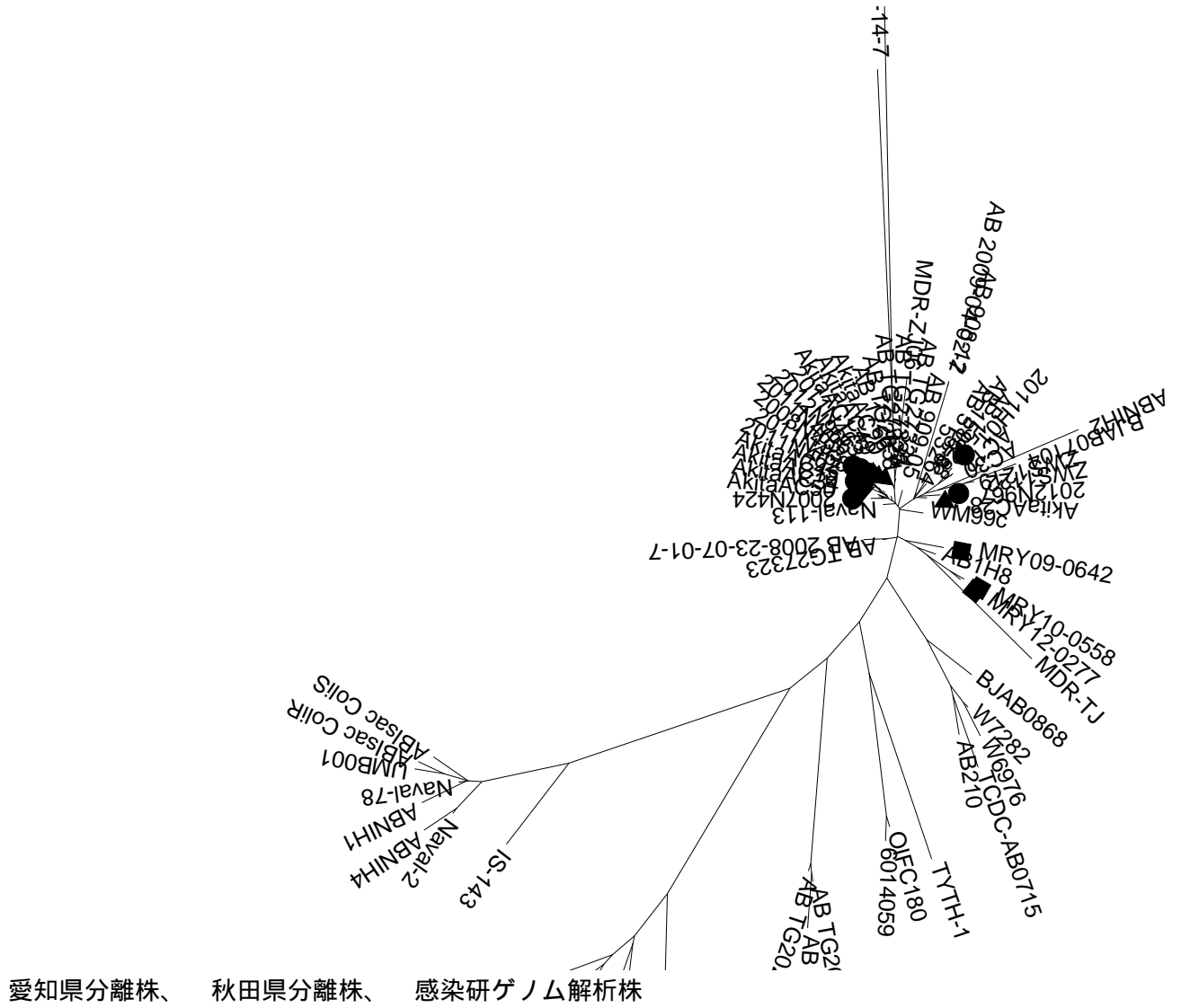


表1 MLST (Pasteur)

	愛知	秋田
ST2	9 (45%)	17
ST22	0	1
ST33	2	0
ST34	1	0
ST151	1	0
ST152	2	0
ST213	1	0
ST235slv	1	0
new	3	0
合計	20	18

表2 薬剤感受性試験結果 (ゲノム解析株)

	CTX	CAZ	IPM	MEPM	AZT	CFPM	PIPC	AMK	CPEX	MINO	CL	G
7N424	R	R	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R
8N493	R	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	R
11N462	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
11N463	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
11N465	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R
11N468	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
12N966	R	R	S	S	R	R	R	R	R	NA	S	R
12N967	R	R	S	I	R	R	R	R	R	I	S	R
11H01	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
AC18	R	R	S	S	R	I	R	R	R	S	S	R
AC20	R	R	S	S	I	S	R	R	R	S	S	R
AC28	R	R	S	R	I	S	R	S	R	S	S	R
AC34	R	R	S	S	R	I	R	S	R	S	S	S
AC45	R	R	S	R	R	R	R	S	R	I	S	S
AC49	R	R	S	R	I	I	R	S	R	S	S	S
AC50	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S
AC173	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	S	R

表3 ResFinder によって全ゲノム塩基配列データ中から見つけれられた薬剤耐性遺伝子

	OXA -66	OXA- 83	OXA- 23	ADC- 25	TEM- 1D	<i>aac</i> (6') Ib	<i>aacA4</i>	<i>aph</i> (3')- Ic	<i>aac</i> (3)- Ia	<i>aad</i> A1	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>armA</i>	<i>mph</i> (E)	<i>msr</i> (E)	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)	<i>catB8</i>
7N424	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
8N493	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
11N462	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11N463	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11N465	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
11N468	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12N966	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
12N967	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
11H01	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
AC18	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
AC20	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
AC28	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
AC34	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
AC45	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
AC49	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
AC50	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
AC173	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+