

秋田県に侵淫している多剤耐性緑膿菌の耐性機構と 有効な抗生物質の用法，分子疫学的解析技術に関する研究

八柳 潤 今野 貴之 齊藤 志保子

多剤耐性緑膿菌(MDRP)は国内で死者を伴う院内感染事例を惹起しているが、秋田県においてはMDRPの分離実態すら明らかではない。医療法が改正され、地方衛生研究所にはMDRP院内感染事例発生時の行政対応を科学的に支援する役割が課せられたことから、必要な技術を導入・確立する目的で秋田県の医療機関におけるMDRPの侵淫実態、MDRPの薬剤性遺伝子、抗生物質併用法の効果などの基礎的な検討を実施した。医療機関からこれまで送付された緑膿菌167株中、40株がMDRPと同定された。そのうち、21株が同一医療機関において分離され、県内でもMDRPによる院内感染様事例が発生していたことが示された。MDRP34株を供試してイミペネムとアミカシン耐性遺伝子を検索したところ、31株がIMP、1株がVIM、23株がaac(6')-Iac遺伝子を保有していた。一方、MDRP32株のうち4株には単独で有効な薬剤が認められず、抗生物質を併用した場合のみ有効であることが示された。MDRPが秋田県にも侵淫し、院内感染様事例を惹起していることが示された。MDRPに特異的な耐性遺伝子の一部が解明され、MDRP遺伝子診断法確立の端緒となったが、今後もさらなる検討が必要である。一方、BCプレートによる検討により、4株のMDRPについては抗生物質を併用した場合にのみ有効であることが示されたが、その組み合わせが臨床でも有効かどうかについては、さらなる検討が必要である。

1. 緒言

多剤耐性緑膿菌(MDRP)は国内で死者を伴う院内感染事例を惹起している。MDRPは感染防御機能の低下した患者に肺炎、敗血症、エンドトキシンショック、多臓器不全等を惹起して致命的となる場合があるが、ほぼ全ての抗生物質に耐性であるためにMDRP感染者の治療は困難を極める。平成19年3月に医療法が改正され、MDRPによる院内感染対策に行政も密接に関与する必要が出てきたことにより、地方衛生研究所にはその行政対応を科学的に支援するための技術を導入・確立する役割が求められることとなった。MDRPによる院内感染事例が発生した際には、MDRPを迅速且つ的確に同定するだけでなく、感染源・感染ルート の解明が必要となる。さらには、感染者の治療に資する情報も得ることが望ましい。このような背景に立脚し、本調査研究事業はMDRPの遺伝子診断技術と分子疫学解析手法の導入・確立、そして感染者の治療に資する抗生物質併用法について検討することを目的として実施した。秋田県においては、医療機関におけるMDRPの分離実態すら明らかではない。そ

のため、今回は、秋田県の医療機関におけるMDRPの侵淫実態、分離されたMDRPの薬剤性遺伝子、県内分離株を供試して実施した抗生物質併用法など、基礎的な検討を実施した。

2. 方法

2.1 MDRPの検索

2005年10月から2008年10月までに、医療機関からMDRPとして分与された緑膿菌32株及び耐性遺伝子精査のために2001年9月から2008年10月まで医療機関から送付された緑膿菌135株、合計167株をMDRPの検索に供した。MDRPの同定は感染症における薬剤耐性緑膿菌の届出基準に従い、KB法で実施した感受性試験における発育阻止円の直径がイミペネムディスク：13mm以下、アミカシンディスク：14mm以下、シプロフロキサシンディスク：15mm以下の場合、被検緑膿菌をMDRPとした。

2.2 MDRPの耐性遺伝子の検索

表現系からMDRPと同定された40株中34株を供試して、イミペネムとアミカシン耐性遺伝子

を検索した。イミペネム耐性遺伝子としては IMP と VIM を検索し、これらが検出されなかった 2 株についてカルバペネマーゼである SPM-1, GIM-1, さらにオキサシリナーゼのうちカルバペネマーゼ活性を有する OXA-23, -24, -58 を PCR により検索した。

アミカシン耐性遺伝子としては *aac(6')-Iae* を検索し、これが検出されなかった 11 株についてアミノグリコシド修飾酵素遺伝子である ANT(4')-IIa,b, *aac(6')-Ib* (*aacA4*), *aac(6')-I_p*, q, t, v, h, s, u, x, i, l, m そして 16SrRNA Methylase である *rmtD*, *rmtA*, *rmtB*, *armA* を検索した。一方、アミカシンに対して高度な耐性を示すにも関わらず *aac(6')-Iae* 遺伝子が検出されなかった 6 株について、クラス 1 インテグロンに特有の *integrase 1* 遺伝子を標的とした PCR によりクラス 1 インテグロンの検出を試み、クラス 1 インテグロンが検出された 4 株について、コードされている耐性遺伝子を特定するために、インテグロン遺伝子の全長をシーケンスした。

2.3 抗生物質併用法による県内で分離された MDRP に有効な抗生物質の検索

MDRP34 株中、同一人から重複して分離されたと考えられる株を除いた 32 株について、BC プレート「栄研」を使用して有効な薬剤を検索した。

2.4 同一医療機関で分離された MDRP の PFGE パターン解析

2002 年 10 月から 2006 年 2 月にかけて県内の同一医療機関において分離された MDRP 18 株の分子疫学的関連について検討するために、SPEIJER らが報告した *SpeI* PFGE 法を試行した。

3. 結果・考察

3.1 MDRP の検索

合計 162 株の緑膿菌分離株について KB 法により薬剤耐性の有無を調べた結果、40 株の MDRP が同定された（表 1）。MDRP 疑いとして分与された 32 株のうち、KB 法により実際に MDRP と同定された株は 6 株のみであった。このことは、医療機関において菌株保存中に MDRP の薬剤耐性遺伝子が脱落した結果による可能性を示唆するものと考えられる一方、医療機関における MDRP の同定精度に検討の余地が存在することを示唆していた。

40 株の MDRP のうち、21 株が同一医療機関（SK）において分離された。その年次別分離数は次のとおりである。2003 年：3 株、2004 年：4 株、2005 年：12 株、2006 年：1 株、2007 年：1 株。特に、2005 年は 12 株の MDRP がこの医療機関において分離されており、その背景に何らかの疫学的関連が存在する可能性が考えられた。なお、その他の株は県内の計 7 カ所の医療機関で分離された。

表 1 医療機関年別 MDRP 分離状況（2002～2008）

病院名	MDRP 株数	年別株数						
		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
SK	21		3	4	12	1	1	
AK	5		1	3		1		
OD	7				7			
RS	3	2	1					
ON	1				1			
YK	1						1	
YRK	1		1					
SD	1							1
合計	40	2	6	7	20	2	2	1

3.2 MDRP の耐性遺伝子の検索

同定された MDRP40 株のうち、34 株を耐性遺伝子の検索に供した。その結果を表 2 に示す。イミペネム耐性遺伝子の保有状況を検討した結果、34 株のうち 31 株が IMP 遺伝子、1 株が VIM 遺伝子を保有していたが、2 株は IMP、VIM、その他今回検討したカルバペネマーゼ遺伝子のいずれもが陰性であった。一方、アミカシン耐性遺伝子について検討した結果、34 株のうち 23 株が *aac(6')-Iae* 遺伝子を保有していた。*aac(6')-Iae* 遺伝子陰性の 11 株のうち、2 株が *aac(6')-Ia*、2 株が *aacA7* を保有していたが、残り 7 株は検索した遺伝子のいずれをも保有していなかった。なお、16SrRNA Methylase は近年、アミノグリコシド強度耐性に関与する遺伝子として注目されている。このため、今回検出された 34 株の MDRP について *mtD*、*rmtA*、*rmtB*、*armA* 遺伝子を検索したが、これらの遺伝子を保有する株は認められなかった。

Mβ12、Mβ111、Mβ160、Mβ175 の 4 株がクラス 1 インテグロンを保有していた。これら 4 株のうち、Mβ175 株は複数のインテグロンが共存しているためにシーケンスを決定することができなかった。残り 3 株についてダイレクトシーケンスによりインテグロンにコードされている耐性遺伝子を解析した結果、Mβ12 株のインテグロン (In10) が *aacA7*、Mβ111 株のインテグロン (In70) が IMP、Mβ160 株のインテグロン (In97) が IMP と *aadA5* 遺伝子をコードしていることが明らかとなった。これらのうち、*aadA5* はストレプトマイシン耐性遺伝子であり、アミカシン耐性には関与しない遺伝子であった。なお、PCR により 34 株の MDRP のうち、Mβ-12 株の他に Mβ13 株（同一医療機関で分離。同一人由来の可能性。）が *aacA7* を保有することが示されたが、この遺伝子がアミカシン耐性に実際に関与しているかどうかについて、今後の検討が必要である。

表 2 MDRP34 株に検出されたカルバペネマーゼ遺伝子とアミノグリコシド修飾酵素遺伝子

カルバペネマーゼ遺伝子		アミノグリコシド修飾酵素遺伝子	
IMP1	31	<i>aac(6')-Iae</i>	23
VIM1	1	<i>aac(6')-Ia</i>	2
(-) *	2	<i>aacA7</i>	2
		(-) **	7

* : SPM1, GIM1, OXA23,24,58 (-)

** : ANT(4')IIa,b, *aac(6')-Ib,p,q,t,v,h,s,u,x,I,l,m*, *rmtD,A,B*, *armA* (-)

3.3 抗生物質併用法による県内で分離された MDRP に有効な抗生物質の検索

供試した 32 株の MDRP のうち、18 株がクリンダマイシン (CL) 単独のみ有効、1 株がピペラシリン (PIPC) 単独のみ有効であった。それ以外の 13 株に有効な薬剤の一覧を表 3 に示す。13 株中 6 株が CL 単独に加えて、CL 以外の薬剤を併用した場合、有効な組み合わせが存在し、3 株が PIPC 単独に加えて、PIPC 以外の薬剤を併用した場合、有効な組み合わせが存在した。Mβ-102、110、115、128 の 4 株には単独で有効な薬剤が認められず、薬剤を併用した場合のみ有効な組み合わせが存在した。以上のように、県内で分離され

た MDRP 32 株のうち 24 株に CL が有効であった。しかし、CL は国内における使用認可が得られていない点が問題であり、今後、認可される必要があると考えられる。一方、32 株中 4 株には単独で有効な薬剤が認められなかった。今回 BC プレートで得られた、これら 4 株に有効な薬剤の組み合わせが実際に臨床でも有効かどうかについては、今後、さらなる検討が必要と考えられるが、臨床検査室においては、今後も MDRP を適切に同定することに加えて、BC プレートを使用して、少なくとも *in vitro* で MDRP に有効な薬剤に関する知見を集積する必要があるものと考えられる。

表 3 MDRP13 株に有効な抗生物質 (BC プレート)

Mß	有効な抗生物質								
12	CL	AZT							
13	CL	AZT	PIPC/CPFX	PIPC/AMK					
18	AZT	CL/MEPM	CL/CPFX	CL/REF	PIPC/AMK				
52	CL/REF								
74	CL	PIPC	AMK/AZT	REF/MEPM					
76	CL	PIPC	AMK/AZT						
86	PIPC	CL/MEPM	CL/CAZ	CL/CPFX	CL/REF	CL/AZT	PIPC/AMK	AMK/AZT	
102	CL/MEPM	CL/CAZ	CL/CPFX	CL/REF					
110	CL/CAZ	CL/REF							
115	CL/REF								
117	CL	AMK/AZT							
128	CL/CAZ	CL/CPFX	CL/REF	CL/AZT	AMK/AZT				
129	CL	AMK/AZT							

3. 4 同一医療機関で分離された MDRP の PFGE パターン解析

県内の同一医療機関において 2003 年 10 月から 2006 年 2 月にかけて分離された MDRP 18 株の SpeI PFGE は、いずれもバンド 1 本から数本以内の違いに留まり、分離株が非常に近縁であることが示された。BC プレートの成績を参照すると、18 株中 15 株が CL 単独で有効な株であり、この感受性パターンの均一性も併せて考慮すると、当該病院においては 3 株を除き、同一クローンから派生した MDRP により院内感染様事例が発生した可能性が示唆された。なお、15 株とは薬剤感受性パターンが違う株 3 株の PFGE パターンには、15 株に共通するパターンへのバンドの付加 (2 株) と、スミア化 (1 株) が認められた。

4. まとめ

以上の結果から、MDRP が秋田県内の医療機

関に既に侵淫していることだけではなく、院内感染様事例が既に発生していることが示された。また、遺伝子診断による高精度な MFRP 同定システムを構築し、医療機関からの MDRP 同定依頼があった際には迅速に対応可能な態勢を構築する必要性が示された。そのようなシステムを構築するためには、MDRP に特異的な耐性遺伝子を解明する必要がある、これまでの検討により、その一部は解明されたと考えられる。

参考文献

- 1) Han Spejer, Paul H. M. Savelkoul, Marc J. Bonten, Ellen E. Stobberingh, and Jeroen H. T. Tjhi: Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of Endemicity in an Intensive Care Unit, J. Clin. Microbiol., 37, 1999, 3654-3661.