

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） 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

八柳 潤 鈴木匡弘*¹ 綿引正則*² 佐多徹太郎*²

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，愛知県と秋田県で分離された *Acinetobacter baumannii* の MLST 解析，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。菌種同定に供試した 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% (645 株) と最も多く，次いで *A.nosocomialis* 10%，*A.pittii* 7%，*A.sp.close to 13TU* 2%と続いた。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。さらに，ジーンバンクに登録されているデータと併せた SNP 系統樹解析により，多剤耐性アシネトバクター（MDRA）が他の *A.baumannii* International Clone II 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が示唆された。今回 *A.baumannii* と同定された 645 株のうち MDRA と確認された株は 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。

1. 諸言

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¹⁾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，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いる。実際，JANIS（厚生労働省院内感染対策サーベイランス）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）の院内感染により，26 人が感染し 4 人が死亡するという事例が発生した。また，2010 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平成 24 年度から実施した。研究初年度である平成 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，

*¹ 愛知県衛生研究所，*² 富山県衛生研究所

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 II²⁾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。

平成 25 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, 愛知県と秋田県で分離された *A.baumannii* の MLST 解析と次世代シーケンサーを使用して得た全ゲノムシーケンスデータに基づいた *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により得た全ゲノムシーケンスデータをオンライン解析して *A.baumannii* の薬剤耐性遺伝子を特定した。

2. 方法

2.1 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 *rpoB* 遺伝子の DNA シーケンス解析³⁾と, *A.baumannii* に特異的 (Intrinsic) な OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法⁴⁾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。*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⁵⁾により菌種を確認した。

2.2 *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。

2.3 全ゲノムシーケンスデータに基づいた single nucleotide polymorphisms (SNP) 系統樹解析

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シーケンスデータを得た。得られたデータと, 国立感染症研究所で解析された 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 SNP 系統樹解析を行った。

2.4 全ゲノムシーケンスデータに基づいた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 から次世代シーケンサーを使用して得られた全ゲノムシーケンスデータを ResFinder 2.1 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) により解析し, 薬剤耐性遺伝子を特定した。

3. 結果

3.1 全国で分離されたアシネトバクター属菌の菌種

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*, その他の菌種のシーケンスが系統樹上でそれぞれ同一のクラスターに集積することが示され, *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

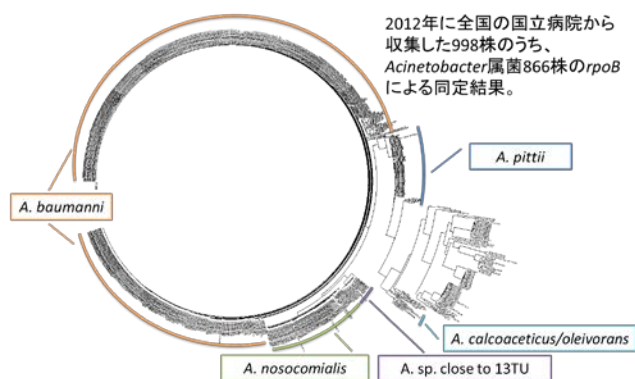


図1 Acinetobacter 属菌 866 株の rpoB 遺伝子シーケンスに基づく系統樹

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、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。

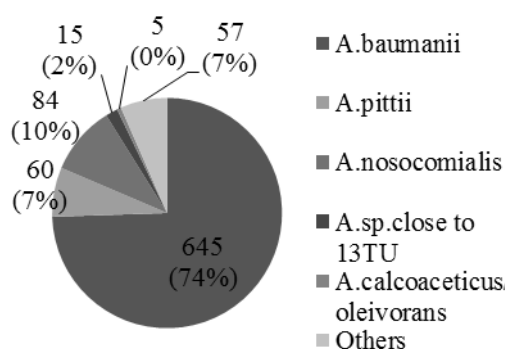


図2 アシネトバクター属菌 866 株の菌種

3.2 愛知県と秋田県で分離された *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 (International

表1 愛知県と秋田県で分離された *A. baumannii* の MLST (Pasteur)

	愛知	秋田
ST2	9	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

clone II) , 1 株のみが ST22 であり、両県とも世界流行株である International clone II がすでに分布していることが示された。

3.3 全ゲノムシーケンスデータに基づいた SNP 系統樹解析

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たが, サブクラスターが異なることが明らかとなった。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

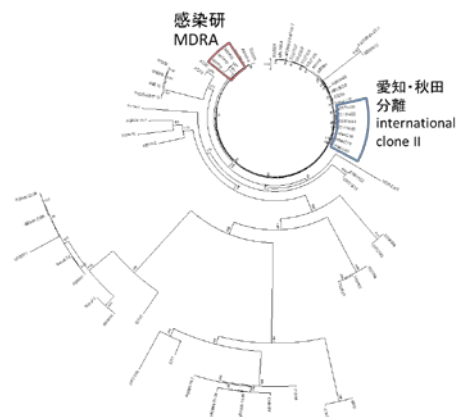


図3 全ゲノムシーケンスデータに基づいた *A. baumannii* の SNP 系統樹

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。

3.4 全ゲノムシーケンスデータに基づいた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, 計7株の *A.baumannii* の全ゲノムシーケンスをオンライン解析した結果特定された薬剤耐性遺伝子の一覧を表2に示した。秋田県で分離された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。一方、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。供試株のうち、アミカシン耐性を示した AC18 (7剤耐性) は *aadA1*, *aac(6')iB*, *armA* 遺伝子を保有していた。これらのアミノグリコシド耐性遺伝子のうち、*armA* 遺伝子は愛知株4株中3株にも検出されており、*armA* 遺伝子が国内の *A.baumannii* に侵淫していることが明らかとなった。

4. 考察

今回、我々は国内の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌866株の菌種同定を実施した。その結果、*A.baumannii* が645株(74%)と最も多く、次いで *A.nosocomialis* 84株(10%), *A.pitti* 60株(7%), *A. sp. close to 13TU* 15株(2%)と続くことが明らかとなった。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。

アシネトバクター属菌の同定については、今回も昨年度同様、*rpoB* 遺伝子のシーケンス解析により実施し、*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。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。

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 が他株とは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。

今回同定された *A.baumannii* 645 株中 MDRA に該当する株は2株のみであった。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

表2 全ゲノムシーケンス解析の結果特定された薬剤耐性遺伝子

	2007N42 4	2008N49 3	2011N46 3	2011N46 5	AC18	AC34	AC45	
<i>aadA1</i>	-	-	+	+	+	-	-	Aminoglycoside resistance
<i>aac(6')Ib-cr</i>	-	+	+	+	+	-	-	Fluoroquinolone and aminoglycoside resistance
<i>strA</i>	+	+	+	+	+	+	+	Aminoglycoside resistance
<i>strB</i>	+	+	+	+	+	+	+	Aminoglycoside resistance
<i>armA</i>	+	-	+	+	+	-	-	Aminoglycoside resistance
<i>blaOXA-66</i>	+	+	+	+	+	+	+	Beta-lactam resistance
<i>blaADC-25</i>	+	+	+	+	+	+	+	
<i>blaTEM-1</i>	-	-	-	-	+	-	+	Beta-lactam resistance
<i>mph(E)</i>	+	-	+	+	+	-	+	Macrolide resistance
<i>msr(E)</i>	+	-	+	+	+	-	+	Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B resistance
<i>sul1</i>	-	-	+	+	+	-	-	Sulphonemide resistance
<i>sul2</i>	+	+	+	-	-	-	-	Sulphonemide resistance
<i>tet(B)</i>	+	+	+	+	+	+	+	Tetracycline resistance

集積することが重要と考えられる。

薬剤耐性菌が保有する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 *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を特定することができた。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特定する方法は、薬剤耐性機構の解明に極めて有効であり、他の薬剤耐性菌の研究にも広く応用可能であると考えられる。秋田県で分離され、アミカシン耐性を示した AC18 (7 剤耐性株) 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明らかになった。これらの遺伝子のうち、*armA* 遺伝子は 16S rRNA methylase 遺伝子であり、これまでも日本国内⁶⁾、韓国⁷⁾、北米⁸⁾で *armA* 遺伝子保有 *A.baumannii* が確認されている。*armA* はアミカシンやトブラマシンなどに対する高度耐性に関与し、プラスミド上のトランスポゾン Tn1548 にコードされている⁸⁾ことから、侵淫拡大が懸念される。

5. まとめ

886 株のアシネトバクテリウム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テリウム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テリウム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。

参考文献

- 1) Peleg, A.Y. et al.: *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen, Clin. Microbiol. Rev., **21**, 2008, 538-582.
- 2) Diancourt, L. et al.: The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool, PLoS One, **5**, 2010, c10034.
- 3) Scola, B.L. et al.: Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species, J. Clin. Microbiol., **44**, 2006, 827-83.
- 4) Turton, J.F. et al.: Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species, J. Clin. Microbiol., **44**, 2006, 2974-2976.
- 5) Ferroni, A. et al.: Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center, J. Clin. Microbiol., **40**, 2002, 3793-3797.
- 6) Yamane, K. et al.: Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. Emerg. Infect. Dis., **11**, 2005, 951-953.
- 7) Lee, H. et al.: Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **56**, 2006, 305-312.
- 8) Doi, Y. et al.: Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. Antimicrob. Agents Chemother. **51**, 2007, 4209-4210.