

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22590523

研究課題名（和文）

病院感染対策の効率化をめざした多剤耐性緑膿菌の迅速簡易検出法の開発とその評価

研究課題名（英文） Evaluation of new screening medium to detect multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* for increased efficiency of infection control

研究代表者

川村 久美子 (KAWAMURA KUMIKO)

名古屋大学・医学系研究科（保健）・准教授

研究者番号：30335054

研究成果の概要（和文）：多剤耐性緑膿菌(multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP)による病院感染の増加は大きな社会問題であり、医療現場では病院感染対策が最重要課題となりつつある。本研究では、多剤耐性緑膿菌を検査材料から直接検出できる迅速簡易検出法(MDRPスクリーニング培地)を構築し、病院感染対策における有用性を評価した。

構築したスクリーニング培地は、高い精度(感度, 80.9%; 特異性, 96.7%)を有し、少量菌の検出も可能であった。病院環境調査の結果、病棟内の水周りや畜尿機付近には複数の薬剤耐性菌の生息が確認されたが、本培地はそれらを誤って検出することはなかった。また、本培地の使用により、病院環境調査に必要なコストは、従来の40分の1以下、時間も3分の1と大幅に短縮することが可能となった。本スクリーニング培地は、簡便性と迅速性を併せ持つ安価な検出法であり、本法の導入は病院感染対策の効率化に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) is responsible for severe nosocomial infections, and rapid and accurate methods to detect strains of this bacterium are needed. We developed a new MDRP screening medium by incorporating three antimicrobial agents into an existing medium for the detection of *Pseudomonas* species, CHROMagar™ *Pseudomonas* (CHROMagar). Gram-negative bacteria harboring a variety of β -lactamase genes were then used for the purpose of evaluating MDRP screening medium. As a result, CHROMagar with 1 μ g/ml of amikacin, 4 μ g/ml of imipenem and 1 μ g/ml of ciprofloxacin showed the best detection limit (10^2 CFU/ml), sensitivity (80.9%) and specificity (96.7%). Multidrug-resistant microbes such as extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* were detected in the hospital environments, but the MDRP screening medium did not show false-positive results. The MDRP screening medium is a simple, rapid and cost-effective method compared with conventional methods described in the literature. The use of the MDRP screening medium made it possible to efficiently detect MDRP isolates in clinical material for infection control.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学

キーワード：病院感染、効率化、多剤耐性緑膿菌、検出法、スクリーニング培地

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP) による病院感染の増加が大きな社会問題となりつつある。この多剤耐性緑膿菌 (MDRP) が、病院感染起因菌のなかで特に問題視される理由としては、①MDRP はカルバペネム系、フルオロキノロン系、アミノ配糖体系の3系統の抗菌薬全てに対して耐性を示すことから、現在認可されているほとんどの抗菌薬の効果が期待できないこと、②MDRP の耐性には plasmid 媒介性の耐性遺伝子が関与しているため、plasmid の伝播とともに菌株間や他菌種に容易に拡散する危険性があること、③MDRP は、その起源が緑膿菌であるため、病院環境中、特に湿潤環境に定着しやすく、一旦定着すると消毒薬に抵抗性であることから消滅させることが難しいこと、などが挙げられる。したがって、MDRP による病院感染を防止するためには、迅速かつ正確な検出と日常的な検出状況の監視および定期的なサーベイランスの実施が重要である。

しかしながら、現在 検査室でおこなわれている MDRP 検出法は、材料からの菌の分離、菌名の同定、薬剤感受性試験による多剤耐性の判定と最低でも3日の日数を要するため、決して迅速とはいえない。また、アウトブレイク発生時の環境調査やサーベイランスの折には、大量検体を処理するわけであるが、現行の培養検査で対応するには、労力およびコスト面での負担が大きく、現実的ではない。このような状況の中、臨床現場では、相次いで MDRP による病院感染が発生しており、簡便で安価な迅速検出法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) を one step で検出できる迅速簡易検出法を構築し、病院感染対策における有用性を評価することによって、感染対策の効率化に貢献することを目的とする。

(1) 簡便で精度が高い MDRP スクリーニング培地の確立

MDRP には複数の耐性機序が複雑に関与しているため、検出法にはそれらをもれなく検出できる高い精度が求められる。また、アウトブレイク発生時の環境調査やサーベイランス時の大量検体処理に対応できるような簡便で安価な検出法でなければならない。本研究では、材料から直接 MDRP を検出できる特徴を有し、且つ特別な装置や特殊な手技を必要としない検出法として MDRP スクリーニング培地を確立した。

(2) 病院感染対策における有用性の評価

現在、検査技師は微生物検査の日常業務の傍ら、感染対策に参画しているのが実状である。したがって、労力面で日常業務を圧迫するような検査法の導入は望ましくない。また、アウトブレイク発生を未然に防ぐことが重要とはいえ、医療現場では対費用効果を考慮した感染対策の実施が望ましい。本研究では、MDRP スクリーニング培地が、上記2つの問題を解決し、病院対策の効率化に貢献しうるかを評価するため、実際に環境調査をおこない従来の方法と比較することで、その利便性や経済性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 高性能な MDRP スクリーニング培地の確立

2009年に我々は、既存の緑膿菌選択培地 CHROMagar™ *Pseudomonas* に3種類の抗菌薬アミカシン (amikacin, AMK)、イミペネム (imipenem, IPM)、シプロフロキサシン (ciprofloxacin, CFX) を添加することにより作製した「MDRP スクリーニング培地」を提唱し、3種類の薬剤濃度を AMK 1 µg/ml, IPM 4 もしくは 6 µg/ml, CFX 1 µg/ml に決定した (日臨微誌 19, 2009)。本研究では、病院感染対策の効率化にむけた「MDRP スクリーニング培地」の導入を視野に、本培地の改良と感染対策における有用性を、MDRP を含む各種薬剤耐性菌 (腸内細菌科菌種およびブドウ糖非発酵菌) を用いて検証した。

① 使用菌株の収集と耐性機序別分類

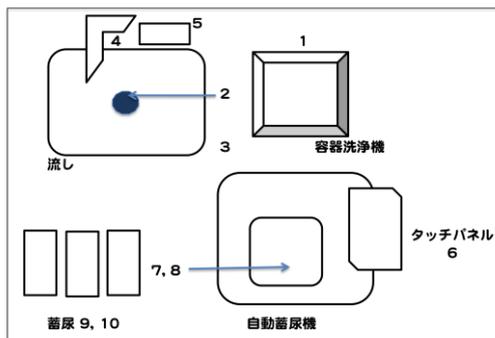
カルバペネム系、フルオロキノロン系ならびにアミノ配糖体系抗菌薬に耐性を獲得した腸内細菌科菌種やブドウ糖非発酵菌 (緑膿菌、アシネトバクター属菌) を収集した。収集した菌株を1剤耐性、2剤耐性、3剤耐性に分類し、PCR および DNA シークエンスにて、それら耐性菌の耐性機序を解析し、耐性機序別に分類後、解析に使用した。

② MDRP スクリーニング培地の精度の検証

耐性機序別に分類した菌株を使用し、本スクリーニング培地で偽陽性および偽陰性が生じる事例がないか検討した。具体的には、耐性機序別に分類した菌株を本スクリーニング培地に接種し、発育の有無とコロニーの色調から MDRP を判定し、感度と特異度を求めた。陽性判定の基準は、基礎培地とした CHROMagar™ *Pseudomonas* の判定基準 (発育したコロニーの色調が青の場合を緑膿菌 (+)、それ以外の色調を示したものは緑膿菌 (-) と判定) に従った。また、本スクリーニング培地の最少検出感度と培地の安定性も合わせて検討した。

(2) 病院感染対策における有用性の評価

MDRP スクリーニング培地を用いて、病院環境調査を行い、検出精度、利便性、経済性などの面から本培地を総合的に評価し、感染対策における有用性を評価した。具体的には、名古屋大学医学部病院で調査の許可が得られた2病棟のナースステーションの拭き取り調査を実施した。下記に拭き取り調査を行なった場所の見取り図の一部を示す。これまで報告された MDRP による病院感染事例から、病棟内の流しや畜尿機付近の拭き取り調査が有効と思われる。今回の調査は患者さんへの影響を最小限にするよう配慮し、ナースステーション内の流しと畜尿機付近を中心に夜間調査を実施した。



① 検体の採取方法

滅菌綿棒2本にて採取箇所を数回拭き取り、1本はその場でMDRPスクリーニング培地への接種に使用し、もう1本は通常の細菌検査用として輸送培地にいれ研究室まで持ち帰り、培養検査に使用した。

② 検査と結果判定

MDRP スクリーニング培地は接種後、直ちに35°Cの孵卵器にて培養を行なった。培養24時間後と48時間後にそれぞれ発育の有無とコロニーの色調を観察し判定を行なった。対照となる培養検査として、菌の分離、菌名同定、薬剤感受性試験を従来法に従い、実施した。さらに、薬剤耐性菌と判定された場合には、その耐性機序も合わせて解析した。採取した試料中のMDRP陰性については、増菌培養で確認した。具体的には、MDRPスクリーニング培地に接種したあとの綿棒を3日間ハートインフュージョンブロスにて増菌培養し、菌の発育が認められない(ブロスが濁らない)場合を陰性とした。

③ 経済性および利便性の評価

経済性は使用培地や試薬の価格から、1検体あたりの単価を計算した。利便性と経済性については実験に要した時間から評価した。

4. 研究成果

(1) 高性能な MDRP スクリーニング培地の確立

① 薬剤感受性傾向による菌株の分類

収集した菌株すべてを対象にIPM, AMK およびCPFXの最少発育阻止濃度(MIC)を測定し、3剤に対する感受性結果から、3つのカテゴリー(3剤すべてに耐性を示す株、3剤のいずれか2剤に耐性を示す株、3剤のいずれか1剤に耐性を示す株)に分類した。その結果、緑膿菌は、47株が3剤すべてに耐性を示しており、それらのMICは、すべてMDRPの判定基準を満たしていた。以下これら47株をMDRP(positive control)、それ以外の菌株をnon-MDRP(negative control)として検討に用いた。

② 感度と特異度

AMK 1 µg/ml, IPM 4 µg/ml, CPFX 1 µg/ml, および AMK 1 µg/ml, IPM 6 µg/ml, CPFX 1 µg/ml の2条件で作製したスクリーニング培地を比較した。2条件で作製した培地にMDRP 47株を接種すると、条件1(AMK 1 µg/ml, IPM 4 µg/ml, CPFX 1 µg/ml)では38株、条件2(AMK 1 µg/ml, IPM 6 µg/ml, CPFX 1 µg/ml)では33株の発育が認められた。これらの結果から、条件1における感度は80.9%(38/47)、条件2は70.2%(33/47)となり、IPMの添加濃度が高い条件で感度の低下傾向が認められた。一方、non-MDRP株においては、1剤のみに耐性を示す菌株で本培地に発育するものは1株も認められなかったが、2剤に耐性を示す緑膿菌の一部で発育が認められた。また、MDRP以外に3剤耐性のセラチア菌(IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ産生株)とKPC型β-ラクタマーゼ産生肺炎桿菌の発育が認められた。これらはコロニーの色調が異なることから、容易にnon-MDRPと判別することが可能であった。以上の結果から、本培地の特異度は条件1, 2ともに97.8%と良好であった。

③ カルバペネム耐性機序の検出感度への関与

各種耐性菌を用いた検討により、本スクリーニング培地に含まれる抗菌薬3剤のうち、カルバペネム耐性における耐性機序の違いが培地の感度に最も影響することが明らかとなった。カルバペネム耐性機序には、大きく分けて①メタロβ-ラクタマーゼ産生による抗菌薬の分解と②外膜ポーリンの減少があるが、臨床分離株の多くは外膜ポーリン

の減少による耐性である。今回の検討では、メタロβ-ラクタマーゼ産生菌(特にIMP-1)は、本培地で正確に陽性を示した。一方、定義上MDRPと判定された菌株であっても、メタロβ-ラクタマーゼを産生しない株、とくに外膜ポーリンの減少によるカルバペネム耐性株は、カルバペネムの添加濃度6μg/mlの条件では、偽陰性となるが多かった(Table 1)。検討の結果から、カルバペネムの添加濃度を4μg/mlにすれば、外膜ポーリンの減少によるカルバペネム耐性MDRPも正確に検出することができることが確認できた。

Table 1 MDRPスクリーニング培地2条件における各種β-ラクタマーゼ遺伝子保有菌の検出頻度

菌株(株数)	β-ラクタマーゼ遺伝子 ¹⁾	株数	培地上に発育が認められた株数	
			条件1(4μg/ml) ²⁾	条件2(6μg/ml) ³⁾
<i>P. aeruginosa</i> (67)				
1剤耐性(4)	-	4	0	0
			12	0
2剤耐性(16)	IMP-1	3	1	1
	VIM-2	1	1	1
3剤耐性(47)	-	20	12	8
(MDRP)	IMP-1(24), -2(1)	25	24	23
	VIM-1(1), -2(1)	2	2	2
<i>K. pneumoniae</i> (5)				
1剤耐性(2)	IMP-1	1	0	0
	CMY-9	1	0	0
2剤耐性(2)	IMP-1	1	0	0
	NDM-1	1	0	0
3剤耐性(1)	KPC	1	1 ⁴⁾	1 ⁴⁾
<i>S. marcescens</i> (16)				
1剤耐性(4)	-	4	0	0
2剤耐性(1)	-	1	0	0
3剤耐性(11)	IMP-1	11	11 ⁴⁾	10 ⁴⁾

¹⁾ -はβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有していないことを表す

²⁾ 条件1: AMK 1 μg/ml, IPM 4 μg/ml, CPEX 1 μg/ml を添加

³⁾ 条件2: AMK 1 μg/ml, IPM 6 μg/ml, CPEX 1 μg/ml を添加

⁴⁾ 発育したコロニーは白色を呈しており、*Pseudomonas* 属菌でないと判定した

④MDRPスクリーニング培地の最少検出感度と安定性

CHROMagar™ *Pseudomonas* は選択培地としての特異性を高めるために、様々な成分が添加されており、それらの成分が抗菌薬と相乗して検出感度を低くする可能性が考えられた。抗菌薬を添加しないミューラーヒントン寒天培地で得られた菌量をもとに、本スクリーニング培地の最少検出感度を求めたところ、約10² CFU/mlとなった(Table 2)。この最少検出感度は、ミューラーヒントン寒天培地で得られる菌量とほぼ同等の菌量を回収しており、培地成分や抗菌薬の検出感度への影響がないこと、日常検査に充分耐える検出感度であることが確認できた。

培地作製後の安定性を確認したところ、作製後4週までの安定性も確保されることが証明できた。この4週という期間は、現在市販されているスクリーニング培地の保証期間とほぼ同等であり、現場での使用に耐えるものと考えられた。

Table 2 IMP型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子保有株と非保有株における最少検出感度の比較

添加薬剤の条件	IMP型MBL遺伝子の保有	コロニー数				
		10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
条件1(4μg/ml) ¹⁾	-	+++	+++	+++ (1540)	++ (330)	+ (90)
	+	+++	+++	+++ (1780)	++ (200)	+ (55)
条件2(6μg/ml) ²⁾	-	+++	+++	+++ (1300)	++ (210)	+ (20)
	+	+++	+++	+++ (1610)	++ (190)	+ (15)
Control ³⁾	-	+++	+++	+++ (3960)	+++ (1000)	++ (110)
	+	+++	+++	+++ (9300)	++ (830)	+ (75)

+,コロニー数99未満; ++,コロニー数100-999個; +++,コロニー数1,000以上

¹⁾ 条件1: AMK 1 μg/ml, IPM 4 μg/ml, CPEX 1 μg/ml を添加

²⁾ 条件2: AMK 1 μg/ml, IPM 6 μg/ml, CPEX 1 μg/ml を添加

³⁾ 抗菌薬を添加しないCHROMagar™ *Pseudomonas* における菌数をControlとした

(2) 病院感染対策における有用性の評価

①検出された菌種とMDRPの検出

名古屋大学医学部病院で調査の許可がえられた2病棟のナースステーションの流しや畜尿所など20カ所の拭き取り調査を実施した。調査の結果、病院環境中から検出された病原細菌は、大腸菌、肺炎桿菌、エンテロバクター属菌、シトロバクター属菌などの腸内細菌科6菌種と緑膿菌、シュードモナス属菌、アシネトバクター属菌などのブドウ糖非発酵菌8菌種であった。これら病原細菌が多く検出された場所は、腸内細菌科菌種については、畜尿機と流しのシンク部分、ブドウ糖非発酵菌については、流しのシンク部分と流しにおかれたスポンジであった。また、複数菌が同時に検出されるケースと検出される菌量はブドウ糖非発酵菌の方が圧倒的に多い傾向が認められた。

病院環境中に生息する薬剤耐性菌については、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生腸内細菌科菌種とβ-ラクタム系抗菌薬耐性もしくはアミノ配糖体耐性のブドウ糖非発酵菌が畜尿機と流しのシンク部分から複数検出されたが、MDRPが検出されることはなかった。これら薬剤耐性菌は、MDRPスクリーニング培地に発育することはない、偽陽性は認められなかった。

②経済性および利便性の評価

現行の検査に必要な培地や試薬を1検体あたり試算すると、菌の分離に必要な血液寒天培地とマッコンキー寒天培地(各200円/枚)、菌名同定と薬剤感受性試験を行うVITEKカード(各3000円/枚)の合計約6400円/検体となる。これに対し、本培地で行う検査に必要な経費は基礎培地CHROMagar™ *Pseudomonas* 1枚分(33000円/250枚)であり、添加薬剤分のコストを含めても、約150円/検体と大幅なコストの削減となった。

検査に要する時間については、現行の検査に必要な時間は、菌の分離に1日、菌名同定に1日と薬剤感受性試験1日の合計3日。これに対し、本培地で行う検査に必要な時間は、材料接種後におこなう培養時間1日のみである。仮にMDRPの発育が認められた場合、最終判断のための確認試験を必要とするものの、現行よりも2日早く感染対策を開始することができるのは大きなメリットとなる。さらに、MDRPスクリーニング培地の場合の検査時間が扱う検体の数に左右されることがない点も大きなメリットといえる。

(3) 結語

MDRPスクリーニング培地は、簡便性と迅速性を併せ持つ安価な検出法であり、本法の導入は日常検査のみならず、病院感染対策の効率化にも貢献できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)

- ①. MATSUMURA Yasushi, NAGANO Miki, YAGI Tetsuya, (他7名, 4番目). Molecular and clinical characterization of plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* bacteraemia: a comparison with extended-spectrum β -lactamase-producing and non-resistant *E. coli* bacteraemia. Clin. Microbiol. Infect. 査読有、19巻(2)、2013、161-168.
- ②. 横山 覚、川村久美子、八木哲也、荒川 宜親: 多剤耐性緑膿菌の迅速簡易検出法の開発とその評価、日本臨床微生物学雑誌、査読有、22巻(2)、2012、126-134.
- ③. KAWAMURA Kumiko, SAKUMA Ayaka, NAKAMURA Yuka, OGURI Tomoko, SATO Natsumi, KIDO Nobuo: Evaluation of bactericidal effects of a prototype low-temperature nitrogen gas plasma sterilization apparatus. Microbiol. Immunol. 査読有、56巻(7)、2012、431-440.
- ④. 服部 達也、中根邦彦、川村久美子: 尿路感染症由来基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌における多剤耐性化傾向とCTX-M-27の増加、日本臨床微生物学雑誌、査読有、21巻(1)、2011、25-34.
- ⑤. KAWAMURA Kumiko, WACHINO Jun-ichi, KONDO Takaaki, ITO Hideo, ARAKAWA Yoshichika: Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species, J. Antimicrob.

Chemother. 査読有、65巻(9)、2010、1975-1983.

- ⑥. KAWAMURA Kumiko, YOSHIDA Risa, SHIBAYAMA Keigo, OHTA Michio: Virulence genes, quinolone and fluoroquinolone resistance and phylogenetic background of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Japan, Jpn. J. Infect. Dis. 査読有、63巻(2)、2010、113-115.

〔学会発表〕(計20件)

- ①. 横山 覚、後藤 謙介、佐藤 夏巳、八木哲也、川村久美子: 多剤耐性緑膿菌の迅速簡易検出法の開発とその評価、第7回日本臨床検査学教育学会学術大会、2012、8月22-24日、名古屋.
- ②. KAWAMURA Kumiko, HATTORI Tatsuya, ARAKAWA Yoshichika: Evaluation of screening methods to detect metallo β -lactamase-producing Gram-negative bacteria、第85回日本細菌学会総会、2012、3月27-29日、長崎.
- ③. YOKOYAMA Satoru, KAWAMURA Kumiko, HATTORI Tatsuya, ARAKAWA Yoshichika: Development of a new screening medium to detect multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*、第85回日本細菌学会総会、2012、3月27-29日、長崎.
- ④. 横山 覚、服部 達也、中根 邦彦、川村久美子: 病院感染対策の効率化をめざした多剤耐性緑膿菌の迅速簡易検出法の開発とその評価、第23回日本臨床微生物学会総会、2012、1月21-22日、横浜.
- ⑤. 服部 達也、川村久美子、中根 邦彦、荒川 宜親: メタロ β ラクタマーゼ産生菌のスクリーニング法の再評価、第48回日本細菌学会中部支部総会、2011、10月21-22日、名古屋.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村 久美子 (KAWAMURA KUMIKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科 (保健) ・
准教授

研究者番号 : 30335054

(2) 研究分担者

八木 哲也 (YAGI TETSUYA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 70333573

(3) 連携研究者なし