

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791112

研究課題名 (和文)

分子疫学的・細菌学的エビデンスに基づいた多剤耐性緑膿菌院内感染防止システムの構築

研究課題名 (英文)

Infection control measures of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* based on molecular epidemiological analysis and bacteriological evidence

研究代表者

石井 亜矢乃 (ISHII AYANO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：00423294

研究成果の概要：バイオフィーム形成能が高い多剤耐性緑膿菌 (MDRP) やメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生緑膿菌は、環境中に長期に生息することから、院内感染対策上、特に留意する必要がある。なかでも MBL 産生緑膿菌は、ほぼ全ての抗菌薬に高度耐性を示し、プラスミド性耐性遺伝子を菌株・菌種間で伝達する可能性が高い。MDRP や MBL 産生緑膿菌の伝播・拡散防止のためには、標準予防策の遵守を基本とし、バイオフィームを形成させないための医療・療養環境の管理が重要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	0	2,700,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	180,000	3,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：緑膿菌、多剤耐性菌、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌、バイオフィーム、プラスミド、院内感染対策、分子疫学、PFGE法

1. 研究開始当初の背景

近年特に問題となっている院内感染症の原因菌として、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) があげられ、尿路カテーテル留置患者の尿から高頻度に分離される。緑膿菌には異なる薬剤耐

性機序が存在し、バイオフィーム形成の他に、不活化酵素の産生、作用点の変異、透過性障害、排出ポンプ機能の亢進などがある。そのなかで、不活化酵素産生による耐性として、メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生菌の出現

が問題になっている。この薬剤耐性遺伝子はプラスミド上にコードされていることが多く、菌株・菌種間を伝達することにより、耐性遺伝子が拡散する。MBL 産生緑膿菌は、ほぼ全ての抗菌薬に高度耐性を示す傾向が強く、拡散防止策を講じることは必要不可欠である。

2. 研究の目的

MDRPまたはMBL産生緑膿菌を研究対象として、分子疫学的・細菌学的実験を行う。研究対象株のバイオフィーム形成能および薬剤耐性遺伝子の伝達性に関して得られたエビデンスに基づいて、院内感染対策上の問題点を明確にして、有効な院内感染防止策を提言する。

3. 研究の方法

(1) 対象

A県3施設で分離された尿路由来IMP-1型 MBL産生緑膿菌75株(1症例1株)を対象とした。また、比較検討のために、岡山大学泌尿器科で分離された尿路感染症由来MBL非産生緑膿菌66株(1症例1株)を用いた。

(2) PCR法

IMP-1型 MBL産生遺伝子(*bla_{IMP-1}*)の検出は、プライマーの最適条件にて行った。

(3) 薬剤感受性試験

ドライプレート DP25(栄研化学)を用いた。MDRPの判定基準は、感染症法に基づきMIC(最小発育阻止濃度)値: イミペネム(IPM) $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 、シプロフロキサシン(CPFX) $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ 、アミカシン(AMK) $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ とした。

(4) バイオフィームアッセイ

96穴ポリスチレン製滅菌平底プレートを用い、供試菌を人工尿中、37°Cで静置培養した。24時間後に形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレットにて染色した。その溶出液のOD₅₇₀値(3穴の平均値)を求めて、

バイオフィーム形成能とし、高度形成群(OD₅₇₀ ≥ 1)、中等度形成群(1 > OD₅₇₀ ≥ 0.5)、低度形成群(0.5 > OD₅₇₀ ≥ 0)の3群に分類した。

(5) 統計学的解析

データの解析はMann-WhitneyのU検定を用い、 $P < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

(6) 接合伝達実験(フィルター法)

受容菌として *Pseudomonas aeruginosa* ML5017株、イミペネムおよびリファンピシン添加の選択培地を用い、供与菌数あたりの伝達頻度を算出した。伝達の有無は、PCR法およびPFGE法により確認した。

(7) パルスフィールドゲル電気泳動法

(PFGE解析)

BIO-RAD社のプロトコールに準じた。ゲルブロックを制限酵素 *Spe I* 処理後、アガロースゲルに埋め込み、Bio-Rad CHEF DR-IIIを使用して泳動を行った。泳動終了後、ゲルをSYBR Green Iで染色し、デンドログラムを作成した。

4. 研究成果

(1) MBL産生緑膿菌株の薬剤耐性状況とバイオフィーム形成能

MBL産生緑膿菌株が *bla_{IMP-1}* 耐性遺伝子保有株であることを確認後、薬剤感受性試験を行った。MBL産生緑膿菌75株中、67株(89.3%)がIPM, CPFX, AMKの3剤に耐性を示すMDRPであり、残り8株はIPM, CPFXの2剤に耐性を示した。バイオフィーム高度形成群は35株(46.7%)、中等度31株(41.3%)、低度9株(12.0%)であった。バイオフィーム高度・中等度形成群(66株)では3剤耐性のMDRP(61株)が92.4%を占めていた。

(2) MBL産生・非産生緑膿菌株のバイオフィーム形成能の比較(図)

MBL産生緑膿菌75株のバイオフィーム形成能の平均OD₅₇₀値1.25 ± 0.09 (Mean ± SE)は、

MBL非産生緑膿菌66株の平均OD₅₇₀値0.43±0.07 (Mean±SE) に比較して、約3倍の高値であり、MBL産生緑膿菌株は有意に高いバイオフィーム形成能を示した。(P<0.001)

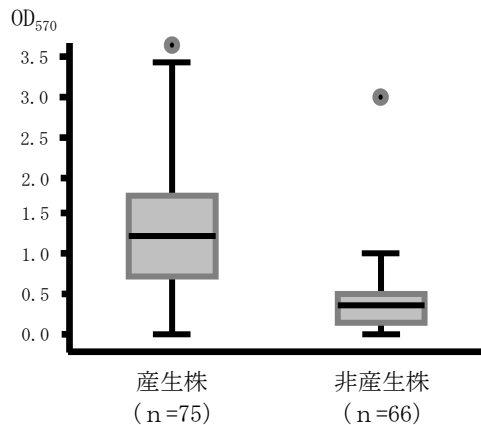


図 尿路由来 MBL 産生・非産生緑膿菌のバイオフィーム形成能の比較

(3) MBL産生緑膿菌株のバイオフィーム形成能の比較—施設別—

施設 A で分離された MBL 産生緑膿菌株のバイオフィーム形成能は低度から高度まで広く分布し、高度・中等度の株が 81.6%、施設 B では高度・中等度の株が 96.7%、施設 C では中等度の株が 71.4% を占めた。つまり、バイオフィーム形成能は施設ごとに特徴があることが明らかとなった。

(3) 薬剤耐性遺伝子の伝達性

接合伝達実験を行った MBL 産生緑膿菌 15 株のうち 5 株が、比較的高い伝達頻度 (10^{-4} ~ 10^{-6}) で、*bla*_{IMP-1} 遺伝子を伝達した。

(4) PFGE解析 (類似係数80%のデンドログラム)

尿路由来 MBL 産生緑膿菌 75 株には同一株を認めなかったが、類似係数 80% の類似株を 7 組 14 株認めた。類似株 7 組は全て同じ施設内で分離された株で構成され、異なる施設間での類似株は認めなかった。施設 C で分離された類似株 1 組の分離日の隔たりは 4 日、施設 B で分離された類似株 1 組の分離日の隔たりは 5 日であ

ったことから、直接的な交差感染の可能性が考えられた。その他 5 組の分離日には、3 週間から約 3 ヶ月の隔たりがあり、環境中に生息していた MBL 産生緑膿菌を介した交差感染の可能性が示唆された。

(5) 考察

緑膿菌は尿路感染症の原因菌となる代表的な菌種のひとつであり、尿路に基礎疾患を有する複雑性尿路感染症、特に尿路にカテーテルが留置された患者からは頻りに分離される。緑膿菌は尿路上皮あるいは尿路内異物 (カテーテル、結石) に付着すると、そのすぐれた環境適応能力として菌体外多糖 (グリコカリックス) を産生し、バイオフィームを形成する。緑膿菌をはじめとする細菌バイオフィームの形成は、抗菌薬および生体の感染防御系からの隠れ家となり、難治化の重要な因子となる。緑膿菌は元来弱毒菌であり、たとえ尿路に基礎疾患を有していても尿流動態が比較的良好 (尿路閉塞が無い状態) に保たれていれば、発熱などの急性症状を呈することはまれである。その一方で、緑膿菌性尿路感染症患者はいわゆる緑膿菌保菌者となるケースが多く、病院・病棟内で交差感染の汚染源となり得る。

免疫抑制宿主を主体とした長期入院患者には尿路カテーテルが留置されることが多いことから、緑膿菌性尿路バイオフィーム感染症は泌尿器科病棟のみならず医療施設全体の問題として対策に取り組む必要がある。また、バイオフィーム形成能が高い緑膿菌は環境中に生息しやすいことを考慮すると、特に水周りの環境を清潔かつ乾燥した状態に保ち、バイオフィーム形成の場とならないよう医療環境の管理を徹底する必要がある。

最近では、外来患者の尿中から MDRP や MBL 産生緑膿菌が検出されるようになった。MDRP

は五類感染症定点把握疾患に指定され、注意を喚起されているが、全数把握の感染症ではない。大規模病院においては、MDRP に対する関心度は高いが、中・小規模病院や療養型施設では薬剤耐性菌に関する情報提供が組織的になされているとは言い難い。MDRP は必ずしも感染症の原因菌となっていない場合が多く、患者は保菌状態で原疾患の治療や医療処置を受けていることを考慮すると、大病院に限らず、中・小規模病院においても、徹底的な院内感染対策を実施することが求められる。

(6) 結語

① バイオフィーム形成能が高い緑膿菌は、環境中に長期に生息し、プラスミド性遺伝子の伝達により耐性を獲得している可能性がある。

② MDRPやMBL産生緑膿菌の伝播・拡散防止のためには、標準予防策の遵守を基本とし、バイオフィームを形成させないための医療・療養環境の管理が重要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① 石井亜矢乃、狩山玲子、光畑律子、佐古真一、和田耕一郎、上原慎也、渡辺豊彦、門田晃一、公文裕巳：尿路由来メタローβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィーム形成能および分子疫学的検討.

Bacterial Adherence & Biofilm 22:59-64, 2008 (査読無)

- ② 山本満寿美、狩山玲子、光畑律子、石井亜矢乃、上原慎也、渡辺豊彦、門田晃一、公文裕巳、草野展周：メタローβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィーム形成能と耐性遺伝子伝達性の検討. 第42回緑膿菌感染症研究会講演記録 42:95-99,

2008 (査読無)

- ③ 渡辺豊彦、上原慎也、光畑律子、和田耕一郎、石井亜矢乃、狩山玲子、門田晃一、公文裕巳：尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィーム形成能と臨床的因子および薬剤感受性との関連性に関する検討. 第41回緑膿菌感染症研究会講演記録 41:

94-98, 2007 (査読無)

[学会発表] (計3件)

- ① 佐古真一、尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィーム形成能と臨床的背景の関連性の検討、第56回日本化学療法学会西日本支部総会、2008/12/7、広島
- ② 石井亜矢乃、尿路由来メタローβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィーム形成能および分子疫学的検討、第22回Bacterial Adherence & Biofilm学術集会、2008/7/4、淡路
- ③ 山本満寿美、メタローβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィーム形成能および分子疫学的検討、第56回日本化学療法学会総会、2008/6/6、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 亜矢乃 (ISHII AYANO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号：00423294

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

狩山 玲子 (KARIYAMA REIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40112148

公文 裕巳 (KUMON HIROMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30144760