

## 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24年 5月 7日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591291

研究課題名（和文）メタゲノミクスを用いた病院環境の微生物分布の解析と院内感染対策への応用

研究課題名（英文）Analysis of bacterial diversity in hospital environments and application for infection control using metagenomics

## 研究代表者

徳江 豊 (TOKUE YUTAKA)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：80292275

## 研究成果の概要（和文）：

薬剤耐性菌が分離された病院内の環境調査を行う際に、通常の一般細菌培養と同時に分子生物学的微生物同定法で比較検討した。16SrRNA 遺伝子を標的とし PCR で増幅し、クローニング後、シーケンス決定しデータベースにて相同性を比較し菌種同定を行った。目的とする耐性菌の分離率は分子生物学的検討法で高く感度の高い検査であることが推測された。さらに乾燥した検体からも種々の菌を同定することが可能であり、環境汚染の指標として利用できる可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Sequencing of the 16S rRNA gene is recognized as an effective method for bacterial identification. For the control of hospital infections, we compared culture method and of bacterial diversity in the hospital environments where drug-resistant bacteria were isolated. Molecular biological analysis was more sensitive than culture method. This culture-independent analysis was able to detect some bacteria from sample of dried surface, so it was suggested to be available as an index of contaminated environment.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：感染症学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：メタゲノミクス、16S rRNA、病院環境、感染対策

## 1. 研究開始当初の背景

(1) メタゲノミクスを初めとする分子生物学的手法により微生物を検出する方法を用いた環境や生態の細菌叢の解析で、通常の培養可能な微生物の何倍もの培養不能な微生物が存在していることが判明している。クローンライブラリー解析法は、培養に依存することなく検体中に存在する様々な細菌を同定・評価することが可能な分子生物学的な微生物の解析法である。現在まで、細菌のバイオフィルム、海洋、土壌などの環境から医学の分野では生体の腸内、口腔内、皮膚の常在細菌叢などを含めてその解析対象は拡大している (Nature 455:481, 2008)。培養可能な微生物の何倍もの培養不能な微生物が存在していることが判明しており、ある環境における培養不能な微生物の分布や頻度、さらに機能や代謝を推測することが可能である。また検出された菌種の全ゲノムの解析も環境サンプルから可能であることが報告されている (Nature 428:37, 2004)。

(2) 分子生物学的手法を用いて、小児ケア施設における微生物の分布と6ヶ月にわたる経時的变化をみた報告によると、微生物のコンタミネーション源の推定や衛生環境の改善の指標に有用であることが示唆されている (BMC Microbiology 7:27, 2008)。

(3) そこで本研究では、この方法を病院環境学の分野で応用し、多くの培養不能な微生物が病院という特殊な環境においていかなる分布を形成しており、また病院内感染発生時には、目的とする微生物の拡散範囲を知ることが可能となり感染対策の範囲と方法を決定する手がかりとなることが期待される。

## 2. 研究の目的

分子生物学的手法により微生物を検出する方法を用いた環境や生態の細菌叢の解析で、通常の培養可能な微生物の何倍もの培養不能な微生物が存在していることが判明している。病院という特殊な環境において薬剤耐性菌が分離された病院内の部署を対象に環境調査を行う際に、通常の一般細菌培養と同時に分子生物学的手法とを比較検討した。以下の点を明らかにすることで感染症および感染制御に有用な新たな情報を得ることを目的とする。

(1) 現状の把握：部署毎や院内部位別に培養不能な微生物を含めた病原菌の分布状況を知る。

(2) 院内感染発生時などの微生物分布を培養法と比較検討し、汚染範囲の特定や対策の必要性の評価に利用する。

(3) 病院内の清潔度の指標として応用可能な衛生管理の質的マーカーを同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 分子生物学的微生物同定法を含めた実験方法の妥当性を評価するために、培養された既知の細菌および病院内の特定部署2カ所から無菌綿棒を用いて検体を採取し、通常の一般細菌培養と同時にDNA抽出をおこなった。

(2) 16SrRNA 遺伝子を標的とした以下の universal primer を用いてPCR 施行した。

8F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG,

805R: GACTACCAGGGTATCTAATCC,

1391R: GACGGGCGGTGTRCA

PCR 産物からライブラリーを作成し、16SrRNA 遺伝子断片を TOPO TA クローニングキットを

用いて大腸菌にクローニングした後、シーケンスを決定しNCIのBLASTのデータベースにて相同性を比較し菌種を同定した。

(3) 薬剤耐性菌が分離された病院内の環境調査を行う際に、通常的一般細菌培養と同時に分子生物学的微生物同定法で比較検討した。整形外科病棟浴室、北8階、ICUの3カ所で施行した。

#### 4. 研究成果

(1) 環境中の検体からのDNA抽出の確実性、再現性が不安定であったので、再度方法論を含めて検討し生理食塩水もしくは滅菌水に浸した無菌綿棒を用いて検体を採取した後にDNA抽出をおこなったところ、安定した結果を得ることが可能になった。

(2) 多剤耐性菌緑膿菌が分離されたICU病棟での環境検査では(表1)、目的とする耐性菌の分離は認められなかったが、分子生物学的検討法はより多くの菌を検出しており、感度が高い検査であることが推測された。

表1. ICU

ICU	採取場所	培養	16S rRNA	
ベッド5	床	CNS	Corynebacterium sp	
			Pasteurella sp	
	PCパネル	CNS	Staphylococcus sp	
			Uncultured bacterium	
中央手洗い	排水口	Paeruginosa	Corynebacterium	
			Propionibacterium	
			Sphingomonas sp/Erythronomas sp	
ベッド11	シャワー口	GNB	Methylorsetilis sp/Aquatic bacterium	
			挿管チューブ(-)	Acinetobacter sp
				Delftia sp
西手洗い	シャワー口	B.vesicularis, CNS	Actinomyces sp	
			Staphylococcus sp	
	排水口	S.maltophilia, GNB	Corynebacterium sp	
			Xanthobacter sp	

(3) 2剤耐性のアシネトバクターと多剤耐性緑膿菌が分離された北8階病棟での環境調査では(表2)、人工呼吸器管理の患者の挿管チューブの周囲から、培養法と分子生物学的検討ともにアシネトバクター属が同定されたが、両方で分離場所が異なっており相互に補完する結果となった。分子生物学的検討法は培養法に比較して、目的とする菌の検出率が高く、さらに乾燥した検体からも種々の菌を同定することが可能であった。例えば、カーテンからも嫌気性菌の遺伝子が検出されており、環境汚染の指標として利用できる可能性が示唆された。

表2. 北8階病棟

北8階	採取場所	16S rRNA	培養	
スタッフステーション	排泄システム	Corynebacterium sp	(-)	
		Propionibacterium acunes		
	Ns用PC	Staphylococcus sp	(-)	
		Atopobium sp		
	洗浄用蛇口	Acinetobacter sp	(-)	
		Sphingomonas sp		
	洗浄用排水口	Acinetobacter sp	E.cloacae	
		Acinetobacter sp	Stenotrophomonas maltophilia	
	869号室	ベッド欄	Staphylococcus sp	CNS
			Staphylococcus sp	
吸引器		Acinetobacter sp	(+)	
		Actinobacterium		
		Bacteroides sp		
ゴミ箱ふた	Staphylococcus sp	K.pneumoniae, CNS		
	Stenotrophomonas maltophilia	Aspergillus sp		
	Acinetobacter sp	(-)		
868号室	ベッド欄	Fusobacterium sp		
		Corynebacterium sp	Acinetobacter baumannii	
	挿管チューブ	Corynebacterium sp		
867号室	ベッド欄	Staphylococcus aureus	CNS	
		Corynebacterium sp		
	挿管チューブ	Staphylococcus sp	CNS	
		Stenotrophomonas maltophilia	Acinetobacter lwoffii	
865号室	洗し排水口	Acidovorax sp	D.acidovorans	
		Chryseobacterium sp	A. hydrophila	
	カーテン	Stenotrophomonas sp	Stenotrophomonas maltophilia	
		Fusobacterium sp	(-)	
汚物処理室	泌尿器表面	E. coli	(-)	
		E. coli		

(4) アシネトバクター属が創部より分離された患者の経過より、整形外科病棟内の浴室の汚染を疑い施行した環境調査では(表3)、浴室内の手すりや椅子などの環境から培養法と分子生物学的検討ともにアシネトバクター属が同定された。その結果により浴室内の管理法や椅子の素材の見直しを行う契機となった。

表 3. 整形外科病棟浴室

採取場所	16S rRNA	培養
左シャワー	Methylobacterium radiotolerans	水中雑菌
	Sphingomonas/Eythromonas sp	
右シャワー	Sphingomonas sp	(-)
	Brevundimonas sp	
左水道コック	Moraxella sp/Actinomycetales	真菌
	Microrococcus sp	
	Acinetobacter sp	
右水道コック	Moraxella sp	Acinetobacter baumannii
	Paracoccus sp	
イス	Acinetobacter sp	Acinetobacter baumannii
	Paracoccus sp	Stenotrophomonas maltophilia
浴槽排水口	Acinetobacter sp	P. aeruginosa
	Acidovorax sp	
手すり	Actinomycetales/Moraxella sp	Acinetobacter baumannii
	Actinomycetales/Moraxella sp	
床排水口	Sphingomonas sp	Acinetobacter baumannii
	Mesohizobium amorphae	
	Mitsuaria sp	

(5) 本法では薬剤耐性度が不明であり、患者から分離された菌株との一致性は明確にできず今後の検討が必要である

#### 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) Gomi K, Fujimura S, Fuse K, Takane H, Nakano Y, Kariya Y, Kikuchi T, Kurokawa I, Tokue Y, Watanabe A. Antibacterial activity of carbapenems against clinical isolates of respiratory bacterial pathogens in the northeastern region of Japan in 2007. J Infect Chemother、査読有 17:200-206, 2011

2) Watanabe A, Tokue Y, Aoki N, Matsumoto T, Yanagihara K, Higa F, Tsuge H, Nagashima M, Matsuoka H, Sasagawa Y, Matsumoto M, Fujimaki K, Taguchi K, Ariyasu M, Yamamoto N, Kunii O, Shiba K. Criteria for safety evaluation of antimicrobial agents. J Infect Chemother、査読有 17:139-47, 2011

3) Kikuchi T, Watanabe A, Gomi K,

Sakakibara T, Nishimori K, Daito H, Fujimura S, Tazawa R, Inoue A, Ebina M, Tokue Y, Kaku M, Nukiwa T. Association between Mycobacterial genotypes and disease progression in *Mycobacterium avium* pulmonary infection. Thorax、査読有 64:901-907, 2009

[学会発表] (計 7 件)

1) 徳江豊、呼吸器感染症の治療ーレスピラトリーキノロンを中心にー、日本薬学会第 132 年会 2012. 3. 29 北海道大学 (札幌)

2) 徳江豊、教育講演 2 「ニューキノロン系抗菌薬の使い分け」、第 60 回日本感染症学会東日本地方会、第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 2011. 10. 27 山形

3) 徳江豊、教育講演「病院感染対策の実際アウトブレイクへの対応」、日本呼吸器学会東北地方会 2011. 3. 5 仙台

4) 徳江豊、シンポジウム 5 抗菌薬を使用しても改善しない！ 抗菌薬と宿主因子感染症における宿主因子の役割 第 58 回日本化学療法学会 2010. 6. 3 長崎

5) 徳江豊 シンポジウム 4 NICU病院感染予防のためのガイドライン ガイドラインの検証ー感染管理担当者(基礎)の立場から、第 25 回日本環境感染学会 2010. 2. 5 東京

6) 徳江豊、教育セミナー10 抗菌薬の適正使用を含めた病院感染対策、第 25 回日本環境感染学会 2010. 2. 5 東京

7) 徳江豊、ICD講習会 院内感染における耐性菌の現状とその対策 細菌感染症の動向とその対策、第 18 回日本口腔感染症学会

2009.11.14 足利

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳江 豊 (TOKUE YUTAKA)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：80292275

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし