

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2014

課題番号：24406022

研究課題名(和文) タイ国における多剤耐性アシネトバクター・バウマニを中心とする院内感染制御支援

研究課題名(英文) Support of Infection Control of MDRAb in Thailand

研究代表者

朝野 和典 (Tomono, Kazunori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40202204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：多剤耐性A. baumannii (MDRAb) は治療の選択肢が乏しく、世界各国で蔓延し大きな問題となっている。我々は、アジアのMDRAbが高率にblaOXA-23ICUを保有することに着目し、LAMP法による迅速検出法を確立し、スクリーニング手段として用いた。タイ国協力病院の全入院患者を対象とし、アクティブサーベイランスを行い、早期診断により院内感染防御策を約2日早く進めることができ、それにより約50%の院内感染を減らすことに成功した。LAMP法は簡便・迅速・高感度であることから、サーベイランスの手段として適している。本研究によりMDRAb院内感染における早期感染予防策の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Multi-drugs-resistant A. baumannii (MDRAb) is associated with high morbidity and mortality as well as longer hospital stays in a hospital. We established a MDRAb-LAMP method for detecting blaOXA-23-positive MDRAb, which accounts for approximately 95% of MDRAb in Thailand. In this study, we evaluated the efficacy of rapid detection and intervention for nosocomial infection among ICU patients in Thai hospital. All the patients screened for MDRAb with both culture and LAMP by rectal swab and/or sputum (intubated patients only) on admission, weekly and on discharge. By using LAMP method as surveillance, we were able to reduce the rate of MDRAb transmission from 26.8 to 13.8 cases per 1000 patient days ($p=0.03$). MDRAb-LAMP enabled us to find positive patients and start appropriate interventions earlier and we were able to clarify the effect of rapid detection to reduce nosocomial infection.

研究分野：感染制御学

キーワード：院内感染 多剤耐性アシネトバクター・バウマニ ICU

1. 研究開始当初の背景

近年、薬剤耐性菌の出現が世界的に問題となっている。2011年の世界保健デーには、WHOが『Post Antibiotic Era(抗菌薬の効かない時代)』、2013年にはCDCが、『薬剤耐性菌の脅威』といった標語を作り、世界的な薬剤耐性菌の蔓延について強い警戒を促している。一方、我が国においては、院内感染対策が1990年代後半に認知され始め、2000年からの10年程度で有効なシステムを構築することができたため、世界で問題となっている耐性菌、特にカルバペネム耐性細菌の出現頻度は諸外国に比べてかなり低い状況にある(表1)。しかし、世界的な状況を鑑みると、いつ日本に持ち込まれ、蔓延してもおかしくない状況にあり、多剤耐性菌の院内感染防止についての研究は喫緊の課題であった。

表1) 世界のカルバペネム耐性菌の分離率

種	耐性菌分離率			
	アメリカ	ヨーロッパ	アジア	日本
アシネトバクター・バウマニ	50%	50-80%	80-90%	2%
大腸菌	2%	10-25%	5-10%	0.1%
肺炎桿菌	10%	10-25%	0-50%	0.2%

CDC. 2013. Antibiotic resistance threats in the United States
 ECDC. 2013. Summary of latest data on antibiotic resistance in the EU
 WHO. 2014. ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on surveillance

2. 研究の目的

耐性菌の蔓延地域において、院内感染防御策について支援を行うことで、当該地域での耐性菌分離率を低下させることを目的とする。それにより、副次的に日本国内への耐性菌の侵入機会の減少につなげることが可能となる。

これまで、マラリアやデング熱などの熱帯地域特有の感染症についての研究を通して、我々はタイ国マヒドン大学附属ラマチボディ病院と協力関係にあった。本研究の開始に当たり、サイトビジットによる院内感染対策評価を行ったところ、ガウンの使い捨てや手洗いの励行などについて徹底不十分であっ

た。そこで、ラマチボディ病院において院内感染対策の支援を行い、耐性菌の蔓延を改善させることを目的とした。

3. 研究の方法

院内感染対策を進めるに当たり、(1)タイ国におけるカルバペネム耐性アシネトバクター(CRAB)の分子疫学調査、(2)分子疫学調査を元にした迅速診断方法の開発、(3)迅速検査診断法を実際に院内に導入し、アクティブサーベイランスに活用することを段階的に進めた。また、平行して(4)院内感染防御策(手洗いの励行、患者隔離の徹底など)について教育を行った。

4. 研究成果

(1)分子疫学調査

タイ国で分離されたカルバペネム耐性菌173株に対し、保有する薬剤耐性遺伝子について調べた結果、*bla_{OXA-23}*を有するものが94.2%と最も優位(表2)であり、院内では耐性菌が比較的モノクローナルに蔓延していることが明らかとなった。また、当該菌の感染・保菌部位調査を行ったところ、直腸周囲と喀痰(挿管患者のみ)からの検出が多く、この2つの部位を用いればアクティブサーベイランスとして有効であることがわかった。

表2) タイ国におけるCRAB分離株の保有耐性遺伝子

Type number	OXA-10	OXA-23	OXA-24	OXA-51	OXA-58	TEM	IMP	VIM	VEB1	ARR2	CMLA	Total isolates
1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
2	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	2
3	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
4	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	1
5	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	2
6	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	1
7	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	1
8	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	2
9	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	2
10	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	6
11	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	14
12	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	4
13	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	2
14	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	34
15	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	83
16	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	16
17	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	1
Total ^a	170	163	0	173	3	138	0	0	4	140	28	173
% ^b	98.2	94.2	0	100	1.7	79.8	0	0	2.3	80.9	16.2	100

Total^a: Total number of isolates with each resistant gene

%^b: The proportion of isolates with each resistant gene

(2) 迅速診断方法の開発

院内感染において早期発見は重要であるが、従来の培養法では、結果の判明までに約2日を要しており、その間に院内感染が起っていた可能性がある。今回、我々はLAMP法（Loop-Mediated Isothermal Amplification法）を用いた途上国でも簡便に行える迅速診断系を確立した（図1）。臨床検体を用いた事前の検討で感度:88.6%(95% CI: 75.4-96.2%)、特異度:90.8%(95% CI: 81.9-96.2%)ともに培養法とほとんど変わらず、また、検体の採取後40分以内に結果を明らかにすることができ、早期の感染防御策の開始が可能となった。

図1) LAMP法による迅速診断法



簡便性: DNA抽出が不要、恒温で検出可能

迅速性: 検体採取から40分以内に結果が判明

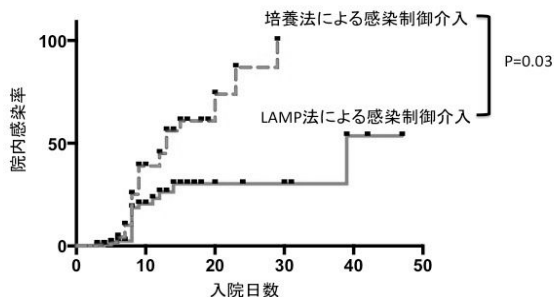
た。

(3) 迅速検査診断法の院内導入

この迅速診断法をタイの協力病院であるラマチボディ病院の集中治療室において、アクティブサーベイランスのスクリーニング方法として導入し、早期迅速診断によって院内感染をどれほど減らすことが可能かについて研究を行った。

図2) 迅速診断法導入による院内伝播率の変化

対象: マヒドン大学附属ラマチボディ病院 ICU入院患者



結果、従来の培養法から迅速診断法にすることで、コホーティングを含めた院内感染防御策を約2日早く進めることができ、それにより、約50%の院内伝播を減らすことに成功した（図2）。

(4) 院内感染防御策

協力病院において、サイトビジットを行い手袋・ガウンなどのディスポーザブル化の徹底や患者ベッド間隔を十分に空けることなどの助言を行い、実践してもらった。また、医療従事者に、院内感染対策についての講義を行うことで、関係者の意識を高めることにつながった。

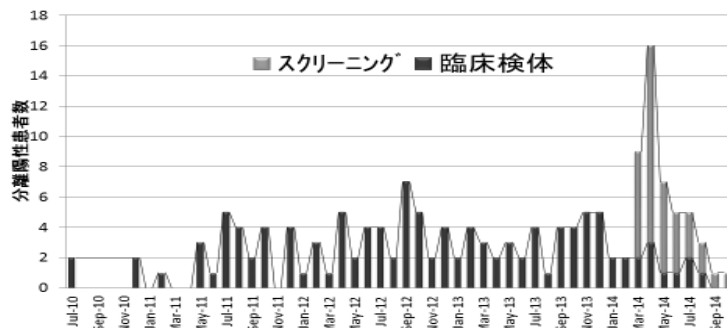
(5) その他の成果

平成26年3月に大阪の市中病院、平成27年2月に長崎の大学病院において、広域抗菌薬として用いられるカルバペネム系抗菌薬に耐性を獲得した薬剤耐性菌であるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌: Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*(CRE)による大規模な院内感染が発生した。このアウトブレイクに対し、我々の確立した検体処理方法によるLAMP法を導入し、院内感染対策に有用であった。

大阪の市中病院におけるアウトブレイクでは、感度:94.1% (95%CI:74.5-99.7)、特異度:96.5%(95%CI:92.7-97.6)で、院内感染の新規事例を大幅に減少させることに成功した（図3）。

図3) 大阪でのCREアウトブレイクにおける

分離陽性患者数の推移



平成26年7月からの約2ヶ月間で、入院1611人に対して、のべ3374検体を採取し、入院時3症例（0.25%）、退院時3症例（0.28%）の陽性例を発見することができた。同時に、院内の環境中や、用いる器具についての検査を行ったところ、水回りや内視鏡からも陽性例を認めた。内視鏡の汚染が原因であるか結果であるかは不明であるが、内視鏡は同日に何度も使うものであり、培養法の結果を待つことはできず、検査されずに見過ごされていた可能性もあり、今回の院内感染の一因に内視鏡があった可能性が示唆された。

(6)まとめ

本研究は、耐性菌の蔓延地域において、院内感染防御策について国際的支援を行うことを目的としていた。タイ国での詳細な耐性菌の状況を明らかにし、その情報を元に院内感染を減少させることに成功した。さらに、日本におけるアウトブレイク事例にも応用し、効果を上げることができ、当初の予定を超える結果をあげることができた。

まず、タイ国で分離されたCRAb株が、薬剤耐性遺伝子のなかでも、*bla*_{oxa-23}を有するものが優位であり、院内では耐性菌が比較的モノクローナルに蔓延していることを明らかにすることができた。次に、耐性菌の迅速診断を目的として、臨床検体を直接用いたLAMP法を確立することができた。従来の遺伝子増幅検査と異なり、尿や血液などの臨床検体に含まれることの多い反応阻害物質に対する影響が少ないとされている。今回の研究結果よりその特徴を生かして臨床検体をほぼ直接サンプルとして用いることができた。同時に感度特異度ともに優れた簡便かつ迅速な検査方法であり、スクリーニングに適していることも確認できた。培養法と比較してほぼ2日早く結果を得ることができることを利用して、タイ国の協力病院の集中治療部での迅速診断・院内感染防御対策に用いたところ、

院内伝播を半減することができた。

さらに、日本でCREのアウトブレイク事例に対しても、タイで実施した同様の方法を導入し、院内感染防御策に高い効果があることを証明することができた。また、従来の培養法では困難であった、内視鏡など、短時間で汚染の有無の判断が必要な医療器材のスクリーニングとして用いることができることも確かめることができた。

LAMP法は目標とした遺伝子配列のみの増幅を確認する方法であり、CRAb・CREのように複数の耐性機構が存在する場合には1種類のみでのLAMP法では検出に限界がある。しかし、院内感染事例においては、比較的同一なクローンの蔓延が知られており、今回のタイ国における研究では、1種類の標的遺伝子のみでの検出の有効性を証明することができた。一方で、その他の目的遺伝子に対して用いる場合でも、プライマー設計が可能であり、様々な場面で応用できると考えられる。

世界的な薬剤耐性菌の蔓延状況に対し、特に途上国や中進国の支援を行いつつも日本における耐性菌の増加に備えることが重要である。グローバル時代の薬剤耐性菌は常に日本へ侵入する危険があり、世界の耐性菌対策を支援することは間接的に日本の耐性菌対策となる。

これらの研究を通して我が国でも、LAMP法を用いた簡便な迅速検査法が院内感染アウトブレイク発生時に有用な検査法となることを示唆することができた。病院内で用いるためには、簡便性・迅速性が重要であり、今後もこの点について研究を進めたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Piao Z, Akeda Y, Takeuchi D, Ishii KJ, Ubukata K, Briles DE, Tomono K, Oishi K Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. 2014 Sep 29;32(43):5607-13. doi:10.1016/j.vaccine.2014.07.108. Epub 2014 Aug 12. PMID:25132335 [PubMed - in process] Related citations 査読有
2. Hanaki H, Cui L, Ikeda-Dantsuji Y, Nakae T, Honda J, Yanagihara K, Takesue Y, Matsumoto T, Sunakawa K, Kaku M, Tomono K, Fukuchi K, Kusachi S, Mikamo H, Takata T, Otsuka Y, Nagura O, Fujitani S, Aoki Y, Yamaguchi Y, Tateda K, Kadota J, Kohno S, Niki Y. Antibiotic susceptibility survey of blood-borne MRSA isolates in Japan from 2008 through 2011. *J Infect Chemother*. 2014 Sep;20(9):527-34. doi: 10.1016/j.jiac.2014.06.012. Epub 2014 Jul 22. PMID:25066429 [PubMed - in process] 査読有
3. Tomioka H, Nakagami H, Tenma A, Saito Y, Kaga T, Kanamori T, Tamura N, Tomono K, Kaneda Y, Morishita R. Novel anti-microbial peptide SR-0379 accelerates wound healing via the PI3 kinase / akt/mTOR pathway. *PLoS One*. 2014 Mar 27;9(3):e92597. doi:10.1371/journal.pone.0092597. eCollection 2014. PMID:24675668 [PubMed - in process] 査読有
4. Machida H, Seki M, Yoshioka N, Yabuno K, Miyawaki K, Yoshida H, Yamamoto N, Hamaguchi S, Tomono K. Correlation between outbreaks of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection and use of bronchoscopes suggested by epidemiological analysis. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(1):26-30. PMID:24389477 査読有
5. Seki M, Machida N, Yamagishi Y, Yoshida H, Tomono K. Nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* caused by damaged transesophageal echocardiogram probe used in cardiovascular surgical operations. *J Infect Chemother*. 2013 Aug;19(4):677-81. doi: 10.1007/s10156-012-0542-0. PMID:23292134 査読有
6. Seki M, Gotoh K, Nakamura S, Akeda Y, Yoshii T, Miyaguchi S, Inohara H, Horii T, Oishi K, Iida T, Tomono K. Fatal sepsis caused by an unusual *Klebsiella* species that was misidentified by an automated identification system. *J Med Microbiol*. 2013 May;62(Pt 5):801-3. doi: 10.1099/jmm.0.051334-0. Epub 2013 Feb 28. PMID:23449877 査読有
7. Nakagami H, Nishikawa T, Tamura N, Maeda A, Hibino H, Mochizuki M, Shimosato T, Moriya T, Morishita R, Tamai K, Tomono K, Kaneda Y. Modification of a novel angiogenic peptide, AG30, for the development of novel therapeutic agents. *J Cell Mol Med*. 2012 Jul;16(7):1629-39. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01406.x. PMID:

- ID:21812915 査読有
8. Miyawaki K, Miwa Y, Seki M, Asari S, Tomono K, Kurokawa N. Correlation between the consumption of meropenem or doripenem and meropenem susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in Japan. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35: 946-9. PMID:22687536 査読有
 9. Isobe M, Uejima E, Seki M, Yamagishi Y, Miyawaki K, Yabuno K, Masaoka M, Hamaguchi S, Yoshioka N, Tomono K Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia at a university hospital in Japan. *J Infect Chemother.* 2012 Dec;18(6):841-7. doi:10.1007/s10156-012-0423-6. Epub 2012 May 12. PMID:22576750 査読有
 10. Ikeda-Dantsuji Y, Nakae T, Ariyoshi K, Mizuno H, Moriyama H, Nagura O, Suwabe A, Fukuchi K, Honda J, Kaku M, Kohno S, Mikamo H, Niki Y, Takesue Y, Tomono K, Yanagihara K, Hanaki H. Limited detectability of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* by the Etest method and its improvement using enriched media. *J Med Microbiol.* 2012 Jul;61(Pt 7):998-1002. doi: 10.1099/jmm.0.043695-0. Epub 2012 Apr 5. PMID:22493282 査読有
 11. Sugimoto K, Onda M, hashimoto S, Matsumura Y, Zhang Q, Fujino Y, Tomono K, Arakawa Y. Factors affecting the effect of treatment of VCM based on quantity of mrsa for hospital-acquired pneumonia. *Jpn J Drug Inform.* 2012;452:46-50. 査読有
[学会発表] (計 2 件)

1. Hamaguchi S, Yamamoto N, Akeda Y, Anusak Kerdsin, Santanirand Pitak, Seki M, Kumthorn Malathum, Oishi K, Tomono K Direct LAMP assay from clinical sample for Carbapenem resistant *A. baumannii* ERS Annual Congress Munich 2014
6th - 10th September 2014
International Congress Center München
Germany
2. Yamamoto N, Hamaguchi S, Akeda Y, Anusak Kerdsin, Santanirand Pitak, Seki M, Kumthorn Malathum, Oishi K, Tomono K Nosocomial Transmission of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAb) among ICU Nosocomial Transmission of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAb) among ICU Patients Detected by CRAb-LAMP
IDWeek2014
07th-12th October 2014
The Pennsylvania Convention Center
Philadelphia, PA USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝野 和典 (TOMONO Kazunori)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40202204

(2) 研究分担者

大石 和徳 (OISHI Kazunori)
国立感染症研究所・感染症疫学センター・
センター長
研究者番号：80160414

関 雅文 (SEKI Masafumi)
大阪大学・医学部付属病院・講師
研究者番号：80432970

明田 幸宏 (AKEDA Yukihiro)
大阪大学・微生物病研究所・特任講師 (常勤)
研究者番号：60444527

(4) 研究協力者

濱口 重人 (HAMAGUCHI Shigeto)
山本 倫久 (YAMAMOTO Norihisa)