

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590675

研究課題名(和文) アシネトバクター属の菌種レベルにおける耐性機序解析および病原性解析

研究課題名(英文) Molecular identification and characterization of Acinetobacter species causing bacteremia

研究代表者

遠藤 史郎 (Endo, Shiro)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：40614491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Acinetobacter属菌はその菌種間において生化学的性状が酷似していることから、一般検査室レベルでは菌種レベルにおける正確な同定が困難であることが知られている。一方で菌種ごとにその病原性が異なっている可能性が指摘されている。本菌種が敗血症などの重症感染症の原因菌となった場合、適切な治療を行うためには正確な菌種同定を行う事が重要になるが、一方で初期の段階ではその疫学的情報が重要になる。本研究では従来、分離頻度が高いと報告されていたA. baumanniiよりも、血液培養においては、A. soliが高頻度に分離されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Acinetobacter baumannii is generally the most frequently isolated Acinetobacter species. According to a recent report from Norway, Acinetobacter nosocomialis was the most frequent isolate from blood cultures. Since the biochemical characteristics of different Acinetobacter spp. are almost identical, accurate identification at the species level is difficult with routine laboratory methods. There is the possibility of different clinical outcomes due to infection with different genospecies since a difference in antibiotic susceptibility between A. baumannii and non-A. baumannii has been reported. The isolates included A. soli (13, 27.1%), A. nosocomialis (12, 25%), A. baumannii (9, 18.8%), A. ursingii (8, 16.7%), A. pittii (3, 6.3%), A. genomic species "close to 13TU (1, 2.1%), A. junii (1, 2.1%) and A. guillouinae (1, 2.1%). Accordingly, our findings emphasize the importance of performing further epidemiological investigation of Acinetobacter species.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：Acinetobacter

## 1. 研究開始当初の背景

*Acinetobacter* 属は、近年、メディアで報道されたこともあり、最も注目されている耐性菌である。*Acinetobacter* 属は、病院環境を含めた自然環境中に広く生息しており、湿潤環境のみならず、乾燥した環境表面、さらには健康人の皮膚からも分離される。*Acinetobacter* 属の臨床的問題点は重症感染症、院内感染の原因菌となること、多剤耐性株が出現した場合、治療が困難になること、菌種レベルの同定がなされていないことが挙げられる。一方で研究的課題として、本邦での十分な分子疫学的解析がないこと、薬剤耐性に関する遺伝子解析が不十分であること、菌種レベルでの解析が全くなされていないことがあげられる。*Acinetobacter* 属は生化学的性状がその菌種間で極めて酷似していることから、臨床現場でルーチンに行われている細菌同定検査では正確に菌種レベルまで同定することは困難である (Microbiology, 2009; 155: 2333-41.)。しかし、近年、RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene (*rpoB*) のシーケンス解析により、*Acinetobacter* 属を菌種レベルまで正確に同定することが可能になった (J Clin Microbiol. 2006; 44: 827-32.)。一般的に、*Acinetobacter* 属の中では *A. baumannii* の分離頻度が最も高く 70%以上と言われてきたが、国によっては *A. nosocomialis* の分離頻度が高いなど、今までの定説とは異なる事実が報告されてきている (J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 738-44.)。また、菌種により予後が異なる報告がなされており (J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 1839-46.) *Acinetobacter* 属の菌種レベルの同定は治療を行う際の非常に重要な情報になる。

*Acinetobacter* 属のカルバペネム系薬に対する主な薬剤耐性機序の中で、抗菌薬を不活化 (カルバペナーゼによる加水分解) する耐性機序は MIC を高度に上昇させるため、最も重要な耐性機序である。カルバペネマーゼは、臨床的に切り札的な抗菌薬であるカルバペネム系薬を良好な基質として加水分解するため、治療に与える臨床的影響は極めて大きい。また、*Acinetobacter* 属は菌種によって、主な耐性機序が異なる可能性がある。すでに、研究者は世界で初めてカルバペネム系薬へ耐性を示す *Acinetobacter soli* を分離しており、主な耐性機序が IMP-1 およびポーリンの発現減少であることを解明している (Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:2786-7.)。このように *A. soli* のカルバペネム系薬への耐性機序は OXA タイプ- $\beta$ -ラクタマーゼを主とする *A. baumannii* と異なっている。したがって、菌種ごとの耐性機序を解明することは、治療薬の選択において非常に重要な知見となる。

一方、国内における *Acinetobacter* 属に関連する報告は 2008 年以降、韓国、米国、アラブ首長国連邦からの持ち込み例がみられるのみであった。また、2010 年に報道された東

京都内の大学病院における多剤耐性 *Acinetobacter* 属のアウトブレイクは記憶に新しいが事例報告のみであった。このように *Acinetobacter* 属の重要性はすでに認識されているものの、菌種レベルにおける詳細な解析は全く行われていないため、早急な解析が待たれていた。

研究者は以前より、*Acinetobacter* 属の危険性をいち早く察知し、すでに全国調査を開始していた。全国各地から 305 株の *Acinetobacter* 属を収集し、解析を行ってきた。カルバペネム系薬耐性株は 36 株 (11.8%) あり、*A. baumannii* の主な耐性機序は OXA-66 を中心としたものであること、分離頻度において地域差が存在すること、加えて Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析により、そのほとんどが ST92、すなわち世界的流行株である clonal complex 92 (European clone II) と同一であることを明らかにした (J Antimicrob Chemother. 2012;67:1623-6)。

近い将来、本邦において多剤耐性 *Acinetobacter* 属の分離頻度が近隣のアジア諸国並みに上昇し、診療が困難になることが危惧されている中、その課題に対応するために本研究は必須であると考えられた。

## 2. 研究の目的

臨床的に重症感染症である敗血症の原因菌となった *Acinetobacter* 属を用い、菌種の正確な同定、菌種ごとの分離頻度、主な耐性機序の解明し、院内および市中におけるその特徴を解析し、最終的には *Acinetobacter* 属感染症の新たな治療法の確立に寄与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### [対象菌株]

院内分離株として東北大学病院において血液培養検体より分離された *Acinetobacter* 属を対象とした。また、市中分離株として、国内全域から (株) ビー・エム・エル総合研究所に送られた血液培養検体より分離された *Acinetobacter* 属も対象とした。同一患者からの重複は除いた。*Acinetobacter* 属の同定は、VITEK-2 (シスメックス・ビュオメリュー、神戸)、マイクロスキャン WalkAway (シーメンス、米国) にて行った。

### [菌種レベルの同定]

RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene (*rpoB*) のシーケンス解析を中心に 16S rDNA、*gyr B*、*recA* のシーケンス結果も適宜参考に行った。*A. baumannii* に関しては後述する PCR 法による OXA-51-like 遺伝子保有の有無を検索も行った。

### [薬剤感受性試験]

Clinical and Laboratory Standards Institute

(CLSI)に準拠した寒天平板希釈法により各種薬剤の minimum inhibitory concentration (MIC : 最小発育阻止濃度)を測定した。

[PCR 法を用いたカルバペネム耐性遺伝子の検出]

カルバペネム耐性株について、OXA 型カルバペネマーゼおよびメタロ-β-ラクタマーゼ産生遺伝子を検索した。OXA 型カルバペネマーゼに関しては Insertion Sequence の有無の検討も行った。また、カルバペネム系薬の透過性に関連の可能性が指摘されている *CarO* に関しても検索した。

[Multilocus Sequence Typing]

カルバペネム耐性 *Acinetobacter* に対して、7つのハウスキーピング遺伝子 (*gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, *rpoD*) に関して PCR を行った。続いて各々の PCR 産物に対して、DNA シークエンス解析を行い、得られた解析結果に対して Pudmlst (<http://pudmlst.org/abaumannii/>)でのデータ解析によりシークエンスタイプ (Sequence Type: ST) の決定を行った。

[パルスフィールドゲル電気泳動]

制限酵素を用い、菌株の異同を正確に解析し、同一株が広がっていないかを確認した。

#### 4. 研究成果

菌種レベルでの同定結果は院内分離株においては *A. soli* が 13 株、*A. nosocomialis* が 12 株、*A. baumannii* が 9 株、*A. ursingii* が 8 株、*A. pittii* が 3 株、*A. close to 13TU* が 1 株、*A. junii* が 1 株、*A. guillouniae* が 1 株認められた。Non-*A. baumannii* が多くを占める結果となり、既存の報告とは異なる新たな知見となった。一方で、市中分離株においては *A. baumannii* が 67.5%と多くを占める結果となり、院内分離株と異なった分離頻度となった。

薬剤感受性結果においては院内分離株においては *A. soli* 13 株中 6 株、*A. ursingii* 8 株中 1 株において IPM 4μg/ml の株が認められ、カルバペネム系薬への耐性傾向を示した。院内分離株においては IPM 4μg/ml を示した株は *A. baumannii* 2 株のみであった。これらの IPM 4μg/ml を示した耐性傾向を示す株における耐性機序に関して、院内分離株 *A. soli*、*A. ursingii* 全てにおいて IMP-1 を保有していることが判明した。また、*A. soli* 4 株、*A. ursingii* 1 株において OXA-58-like の保有が確認されたが、全て IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3*, IS*18* とのリンクは確認されずカルバペネム系薬への耐性に関連していない可能性が示唆された。一方でポーリン孔の発現に関連している *CarO* の発現は認められず、これらの Non-*A. baumannii* の耐性機序としては IMP-1+*CarO* による可能性が示唆された。市中分離株においては *A. baumannii* 2 株が OXA-51-like と IS*Aba1* とのリンクが確認さ

れた。このうちの 1 株は IPM の MIC が 4μg/ml であり、この株は *CarO* の発現を認めていたが、他 3 株は (IPM の MIC が 16μg/ml) *CarO* の発現は認められなかった。

MLST 解析に関して院内分離株においては ST80,86,144,161,163,175,262,308 が認められ多様性を示したが、多剤耐性傾向を示す clonal complex 92 に属する ST は認められなかった。市中分離株においては分離された *A. baumannii* 26%において clonal complex 92 に属する ST92, ST76 が認められた。clonal complex 92 に属する株は諸外国の例では一気に広がるのが指摘されているため、今後の動向に注意が必要である。

PFGE 解析の結果では院内分離株において最も分離頻度の多かった *A. soli* は図 1 に示すように 8 つのクラスターに分類された。クラスター A や B は相同性有りと判断されたものの、分離された株が時間的にも空間的にも異なっており、伝播があったことは確認されなかった。次に分離頻度が高かった *A. nosocomialis* は 12 のクラスターに分類され、*A. ursingii* は 8 つのクラスターに分類された。

本研究において院内分離株、市中分離株において *Acinetobacter* 属の分離頻度が異なっている可能性が示された。また、カルバペネム系薬への耐性機序において *A. baumannii* においては OXA 型カルバペネマーゼ産生遺伝子の発現およびポーリン孔の変異が主な耐性機序の可能性が示され、一方 Non-*A. baumannii* においてはメタロ-β-ラクタマーゼ産生遺伝子の発現およびポーリン孔の変異が主な耐性機序の可能性が示され、*Acinetobacter* 属内においても耐性機序が異なっている可能性が本研究により明らかとなった。さらに、市中においてはすでに多剤耐性傾向を示し世界的にその拡大が危惧されている clonal complex 92 が存在することが明らかとなった。市中分離株、院内分離株において異なった結果を解析するためにも今後、さらなる研究が必要である

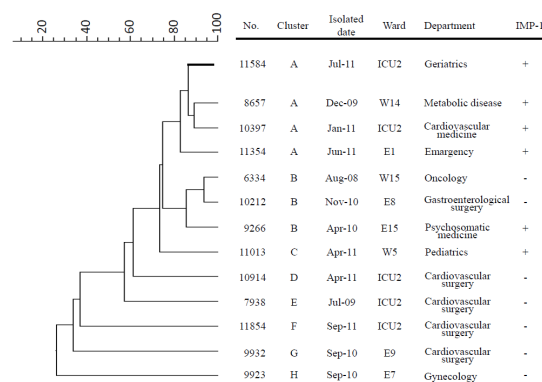


図 1. *A. soli* の PFGE 解析

The cutoff value: 80% similarity. 制限酵素: SmaI. Cluster 解析: GelCompar II v.3.0 and UPGMA. Similarity coefficient: Jaccard. Band tolerance: 0.87%. Optimization: 0.00%.

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1件)

1. Endo S, Yano H, Kanamori H, Inomata S, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Tokuda K, Kitagawa M, and Kaku M: High frequency of *Acinetobacter soli* among *Acinetobacter* isolates causing bacteremia at a Japanese tertiary hospital. J Clin Microbiol 52: 911-915, 2014 査読有

[学会発表](計2件)

1. Endo S, Yano H, Kanamori H, Inomata S, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Tokuda K, Kitagawa M, Kaku M. Molecular epidemiology of *Acinetobacter* spp. causing bacteremia among community hospitals throughout Japan. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 12 May 2014, Barcelona(Spain)
2. 遠藤史郎、矢野寿一、國島広之、平潟洋一、賀来満夫：東北大学病院において臨床分離された *Acinetobacter* spp. の菌種レベルにおける分離頻度、第59回日本臨床検査医学会学術集会、国立京都国際会館(京都)、2012年11月30日

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 史郎 (Endo, Shiro)  
東北大学・大学病院・講師  
研究者番号：40614491

(2)研究分担者

矢野 寿一 (Yano, Hisakazu)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20374944