

[原 著]

新生児集中治療室における MRSA のパルスフィールドゲル電気泳動解析と感染対策

清祐麻紀子¹⁾・佐藤和夫²⁾・関 真人²⁾・高柳 恵³⁾
永沢善三^{3),4)}・小口 晃⁴⁾・永山在明⁴⁾

1) 国立病院機構九州医療センター臨床検査部・臨床研究部

2) 同・小児科

3) 佐賀大学医学部附属病院検査部

4) 福岡大学医学部微生物・免疫学教室

(平成 16 年 4 月 14 日受付, 平成 17 年 1 月 24 日受理)

国立病院機構九州医療センターにおいて、新生児集中治療室 (NICU) から新規に検出される MRSA 患者数は院内全体の半数を占めており、NICU において MRSA は院内感染の重要な問題であった。そこで、1999 年 12 月から 2002 年 5 月の間に NICU から検出された MRSA 62 株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行い、疫学調査を試みた。その結果 MRSA のタイプは主に 11 パターンに分類され、最も多く検出された G タイプによるアウトブレイクと考えられる期間が認められた。また、NICU 内環境検査および医療スタッフ鼻腔内保菌検査を実施した結果、MRSA 保菌児周辺と空調フィルターから MRSA が検出された。環境と医療スタッフ数名から検出された MRSA の PFGE を解析した結果、すべて同様の泳動パターンであり、それらは G タイプと同一タイプであった。環境検査の結果、アウトブレイク時の汚染領域の広がりがうかがえ、MRSA 保菌児の周辺は MRSA により汚染されていることが明らかとなった。そこで、NICU では新生児 TSS 様発疹症や MRSA 感染症が頻発した 2000 年 8 月から NICU 内で独自の Infection Control Team を結成し、院内感染対策の強化を行った。その対策のなかでも、患児を扱う際の手袋着用が最も MRSA の伝播を阻止することができ、MRSA 検出の減少につながったと考えられた。

Key words: MRSA, NICU, パルスフィールドゲル電気泳動, 院内感染対策

序 文

日本において分離される黄色ブドウ球菌のうちおよそ 60% が Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) であり、*Pseudomonas aeruginosa* をはじめとする耐性菌と同様に院内感染対策上問題とされている。また、近年ではバンコマイシン使用増加に伴い、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の報告も増加しており、適切な院内感染対策が求められている。

新生児や低出生体重児では免疫機能が未熟であり、

MRSA をはじめとする日和見感染発生の危険性が高くなることが知られている^{1),2)}。また、近年では主に MRSA が産生するスーパー抗原性外毒素 Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) による新生児特有の疾患である新生児 TSS 様発疹症 (NTED) なども報告されている^{3)~6)}。院内感染の感染経路は (1) 患者が咽頭・鼻腔・皮膚などに保菌している微生物によって感染が起きる内因感染と、(2) 他の患者、医療スタッフあるいは医療器材から感染を受けて発症する外因感染が主なものであるが、外因感染の原因となるケースのほとんどは、医療従事者 (手指) を介した接触感染と考えられている⁷⁾。NICU では患者同士の接触や移動がないことより、医療スタッフによる接触感染を強く疑うことができる。

また、黄色ブドウ球菌は鼻腔内に定着しやすく、健康者でも 20~50% の頻度で常在している。医療ス

著者連絡先: (〒814-0022) 福岡市中央区地行浜 1-8-1
国立病院機構九州医療センター臨床検査部
細菌遺伝子検査室
清祐麻紀子
TEL: 092-852-0700 (内 2309)
FAX: 092-847-8802
E-mail: kiyosuke@qmed.hosp.go.jp

タッフの鼻腔内 MRSA 保菌者は、接触感染予防を目的に除菌の対象となるが、その効果については多くの報告^{8),9)}がある。また、MRSA のムピロシン耐性獲得も新たな問題として生じている。

そこで、MRSA をはじめとする院内感染に対し、その伝播経路を明らかにし、有効な感染経路の遮断対策が必要とされる。MRSA の疫学調査にはさまざまな手法が用いられるが、感染経路の特定のためには従来の表現型分類だけでなく、遺伝子型による分類が必要となる¹⁰⁾。

今回我々は NICU について環境検査と医療スタッフの鼻腔内保菌検査を行い MRSA を検出した。この検出株と NICU 内で検出された MRSA 62 株の PFGE 法を用いて同様に解析を試みた。NICU では 2000 年 8 月より独自の ICT を結成し、院内感染対策を試みた。その対策のなかでも、患児を扱う際の手袋着用が接触感染防止に有効であり、MRSA 検出の減少につながったと考えられたので報告する。

材料と方法

1. MRSA 保菌状況

1999 年 1 月から 2003 年 12 月の期間の NICU 入院患児の監視培養（鼻腔ぬぐい液、気管内挿管児では鼻腔ぬぐい液と気管内吸引液）から、MRSA 新規保菌患児数（月ごと）および MRSA 保菌率（毎週火曜日の入院中患者に MRSA 保菌児の占める割合）を調査した。

2. 対象菌株

1999 年 12 月から 2002 年 12 月の期間に NICU で検出された MRSA のうち保存されていた 62 株を対象とした。なお、MRSA の判定は National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) の微量液体希釈法に準じて行った¹¹⁾。また、対象菌株は 1 患者 1 株とし、初回に検出された株を用いた。

3. MRSA 株遺伝子解析

Gene Path システム（BIO-RAD 社）を用い、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行った。制限酵素は *Sma*I を用い、泳動条件はパルスタイム 5.3～34.9 s、電圧 6.0 V/cm、泳動時間 20 時間で行った。解析には Finger printing Plus ソフトウェア（BIO-RAD 社）を使用し、解析で得られた系統樹の 80% 以上を同一株とし判定した^{12),13)}。

4. NICU 環境検査

環境検査は 2000 年 8 月に NICU 内 50 カ所を対象に行った。検体の採取はクリーンスタンプ MSO 寒天（日水製薬）で直接または滅菌綿棒を湿らせてふき取

ることで採取し、同培地にて 37°C、48 時間好気的に培養し MRSA を検出した。

5. NICU 医療スタッフ鼻腔内保菌検査

鼻腔内保菌検査は NICU スタッフに対して 2000 年 8 月、9 月、および 2002 年 3 月の 3 回実施した。2000 年 8 月、9 月の検査では 46 名を対象に行った。2002 年 3 月の検査では 42 名を対象に行った。検査方法は、マーサチェック（日研生物）を用い、専用スワブを用い各自で鼻腔内をぬぐい、35°C、48 時間好気的に培養しスワブを接種した培地が濃いピンク色に変色した場合、MRSA の存在を推定し、MSO 寒天培地（日水製薬）で確認した。

6. NICU 院内感染対策

2000 年 5 月頃から NTED や MRSA 感染症が頻発したために、NICU では独自に Infection Control Team (ICT) を結成し、さまざまな院内感染対策を試みた。手洗いなどのスタンダードプリコーションの再確認を行い、スタッフの教育、周知徹底を行った。また、交差感染対策として保育器内窓の袖の除去、採血・処置時の作業手順の見直しなどを行った。なかでも、接触感染を効率的に防ぐために、処置時にディスポーザブル手袋着用を徹底することとした。

結 果

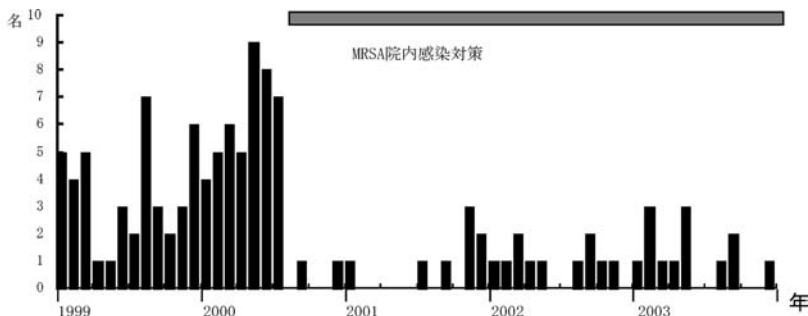
1. MRSA 保菌状況

図 1(1) に MRSA 新規保菌児の推移を示した。2000 年前半のピーク時には月 9 名にも及んだ新規保菌患児数は、対策後月 0～3 名程度で推移していた。また、MRSA 保菌率は流行時には 70% に及んだが、対策後いったん 0% となり、その後 2 年以上 5～10% にとどまっていた（図 1(2)）。

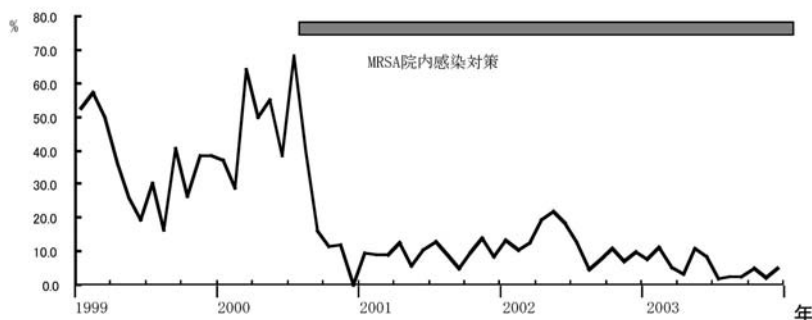
2. 遺伝子学的解析

PFGE 法を用いた解析を行ったところ、NICU から検出された MRSA 62 株は主に 11 パターンに分類され、それぞれを A～K タイプとした（図 2）。A タイプ 3 株、B タイプ 1 株、C タイプ 5 株、D タイプ 17 株、E タイプ 3 株、F タイプ 1 株、G タイプ 27 株、H タイプ 1 株、I タイプ 1 株、J タイプ 1 株、K タイプ 2 株であった。NICU から検出された MRSA のタイプは主に D タイプと G タイプであった。

これら MRSA の月ごとタイプ別推移を図 3 に示した。2000 年前半は D タイプが多く認められ、その後 G タイプへと移行していた。2000 年 5 月頃から MRSA が検出された患児に NTED の症状が見られ、この NTED の症状が見られた患児 6 名から検出された MRSA の生物学的性状はすべてコアグラゼ II



(1) 新規MRSA保菌児の推移



(2) MRSA保菌率の推移

図1 MRSA 新規保菌者・保菌率の推移

型, エンテロトキシンC型, TSST-I産生株であり, PFGE解析の結果, すべて同一のGタイプであった。ICTによる院内感染対策後, Gタイプはいったん消失しアウトブレイクは終息した。対策後に検出されるタイプは連続性を欠き, 単一ではなく複数のタイプが検出されていた。

3. NICU 環境検査

環境検査を行った50カ所中, 5カ所からMRSAが検出された。図4にNICU内の配置図を示す。NICUは入室してすぐにコットフロアがあり, その奥に保育器(重症フロア)が並んでいる。本調査ではこのコットフロア側の空調フィルター(No. 9)から1CFU/cm², 重症フロア側の空調フィルター(No. 10)から5CFU/cm²が各々検出された。また, 重症フロアの奥に配置されたMRSA保菌児周辺の環境検査の結果, レサシバック(No. 25)から20CFU/cm², 臥床板を上下させるバー(No. 29)から2CFU/cm², モニター・アラームスイッチ(No. 32)から2CFU/cm²のMRSAが検出された。

環境検査により検出されたMRSAのうち, 分離培

養が可能であったフィルター以外から検出された株について遺伝子解析を行った。その結果, すべて同一のGタイプであった。これは, 重症フロアの保育器の患児から検出されたタイプと同一であった(図2)。

4. NICU 医療スタッフ鼻腔内保菌検査

2000年8月の医療スタッフの保菌検査では46名中6名(13%)がMRSA陽性, 2000年9月の保菌検査では46名中10名(21.7%)がMRSA陽性であった。また, 2002年3月の保菌検査では42名中1名(2.4%)がMRSA陽性であった。2002年3月に医療スタッフの鼻腔から検出された1株のPFGE解析を行った結果, アウトブレイクしていたGタイプと同一株であった。また, 2000年8月および9月の医療スタッフ鼻腔検査にて検出された株については株を保存しておらず, 解析できなかった。

5. NICU 院内感染対策

2000年8月からの院内感染対策の結果, 図1に示すように, 新規MRSA保菌児, MRSA保菌率は激減した。

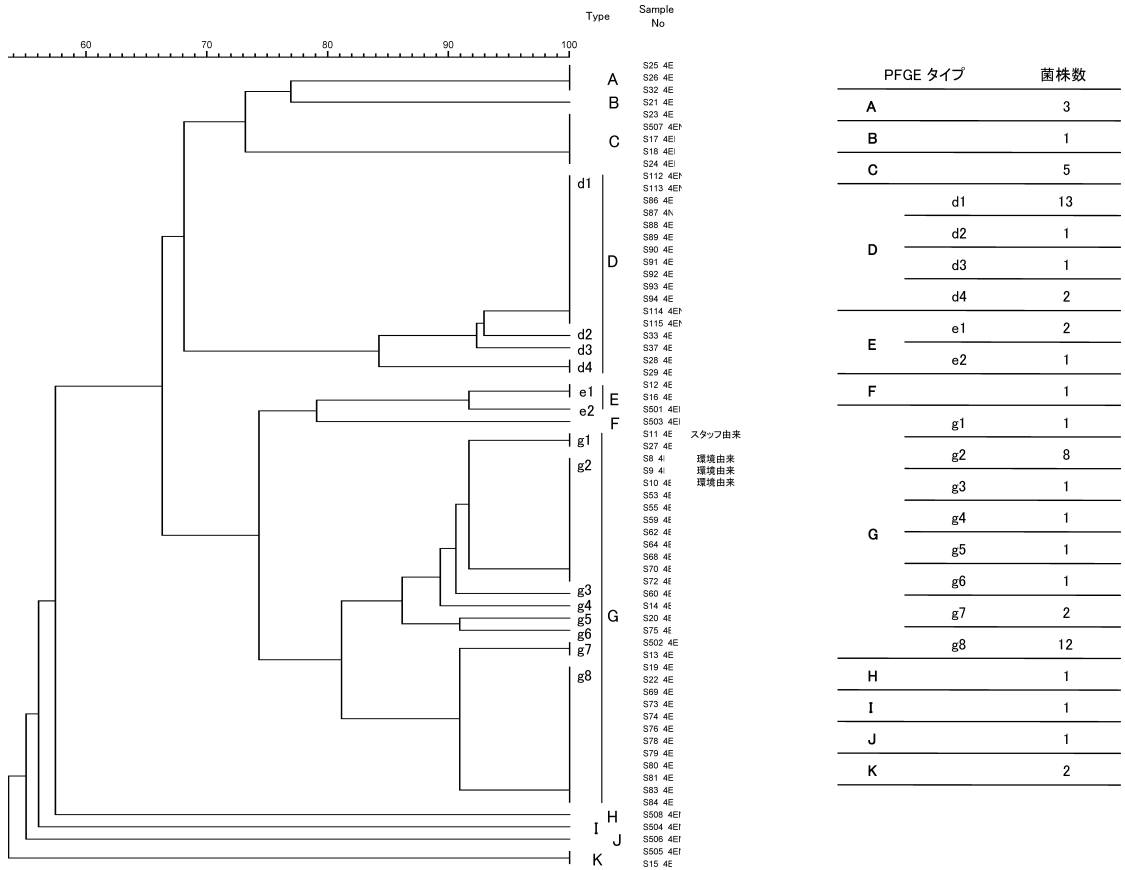


図2 患者由来 MRSA 62 株と環境, スタッフ検出 MRSA 4 株の PFGE 解析系統樹

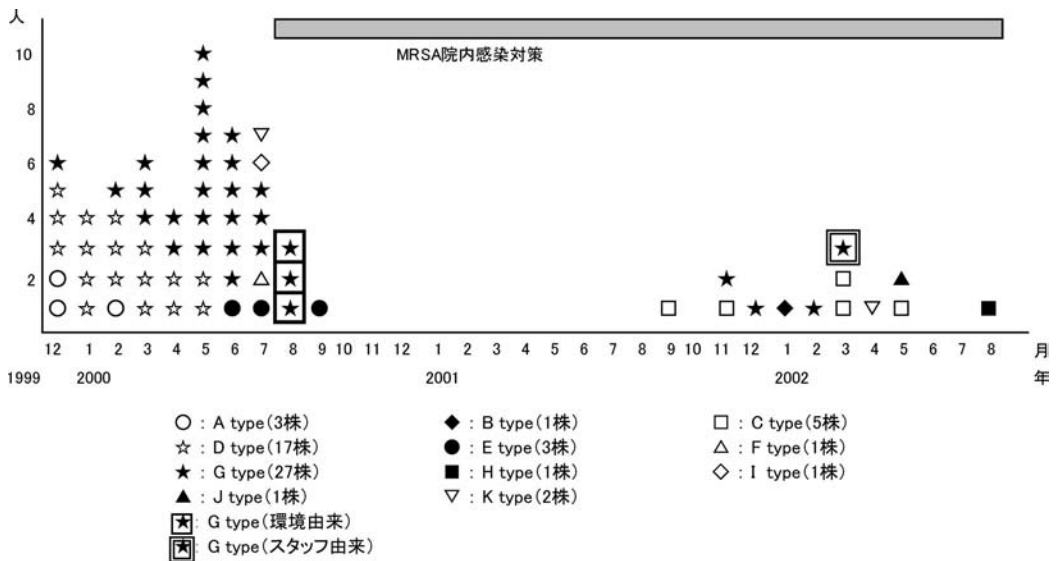


図3 PFGE 法による MRSA タイプ別推移

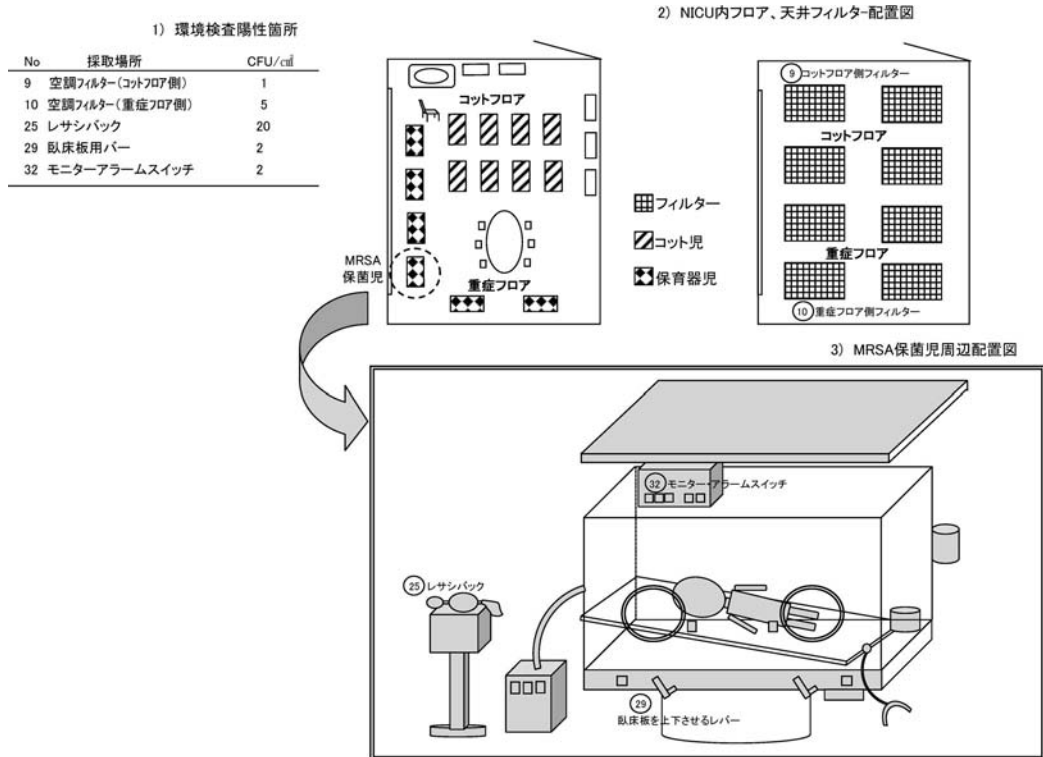


図4 NICU内MRSA環境検査結果

考 察

PFGEを用いた院内におけるMRSA感染に関する解析の報告は多く、いずれも交差感染の可能性を示唆している。竹村らの報告¹⁴⁾でも多数の菌が分離された患児が感染源になりえ、またその患児に接触することにより伝播が起こる可能性を示している。今回の環境検査の結果、MRSAは保菌児の周囲から主に検出され、最も多く検出された場所はレサシバックの握り手であり、MRSAによる汚染は主に手指が触れる箇所であることが再確認された。このことは、一人の患者がMRSAに感染すると、その周辺は手指が触れる範囲を中心に汚染され、周辺機器や医療スタッフを介す接触感染が繰り返され、MRSAが伝播していくことを示唆しているものと考えられた。さらに、2カ所の空調フィルターからMRSAが検出され、MRSA保菌児が少ないコットフロアの空調フィルターからもMRSAが検出された。ヒトが直接触れることのない領域である床や空調フィルターが感染源となることは考えにくいとされているが、長期間にわたりMRSAが蔓延した結果、汚染領域が広がったものと考えられた。

医療スタッフにおけるMRSA保菌率はおおむね5~10%と報告されている¹⁵⁾。本調査における2000年8月の保菌率は13%と高い傾向にあった。アウトブレイク時にはその汚染領域は広く、環境だけでなく医療スタッフにも保菌者が増加し、MRSAの減少に伴いその保菌率は低下するものと思われる。今回、2000年8月の保菌検査後、MRSA保菌の有無に関係なく対象者全員にムピロシン軟膏を使用し除菌を試みたところ、除菌3名、無効3名、新定着7名であった。この新規定着7名という結果は、MRSAによる汚染が広がっている際の除菌の困難さを示唆している。一方、鼻腔内ブドウ球菌を除去することで手指の保菌率も有意に低下する¹⁶⁾ため、医療従事者の保菌者への鼻腔内除菌は有用との考え方もある¹⁷⁾。しかしながら、医療スタッフの保菌検査には検査費用もかかり、プライバシーの問題も軽視できない。保菌検査の意義として(1)スタッフの保菌者を除菌することで伝播の要因を削除すること、(2)職員が調査に参加することで院内規模で感染防止に取り組む姿勢をつくる啓蒙などが考えられる。後者の意義も重要であり、スタッフの院内感染に対する意識向上として、調査は有効なもので

あろう。NICU では MRSA 保菌児・保菌率が上昇した際にはスタッフの保菌検査を行うなど、今後も必要に応じて調査していきたい。

本解析の結果から、MRSA 流行の原因は MRSA 保菌児、感染児からの交差感染により伝播していることが示された。これらより、NICU では独自の ICT を結成し、院内感染対策を試みた。以前は「1 処置 2 手洗い」をルールとしていたが、十分守られていないのが現状であった。NICU における処置時の手袋装着による保菌率の有意な低下が複数報告されており^{18)~20)}、今回の対策においても手袋の着用を徹底を対策の重点とし、結果的に MRSA の流行を終息させた大きな要因と考えられた。

対策後に検出された MRSA は複数のタイプが検出されており、散発的に外部から持ち込まれている可能性も推測される。一方では少数ながら、対策後も G タイプが検出され続けていた。以前から NICU に存在する MRSA が現在まで検出されていることから、どこかに MRSA が残り何らかの経路で交差感染している可能性も推測され、今後も定期的な追跡を行っていく必要があると思われる。また、MRSA 検出件数が減少した現在も、ICT は活動を続け、手袋装着をはじめとする院内感染対策を継続している。しかし、NICU 全体の MRSA 検出頻度が減少してきたことを考慮し、感染対策効果をうかがいながらガウン・キャップ使用の廃止や、ある程度の在胎週以上の児に対する手袋着用の緩和も試みている。

院内感染対策として最も重要なことは医療従事者の感染症に対する意識の再認識であり、ICT を中心に医療スタッフ全員で今後も院内感染対策に取り組み続ける努力が必要である。また今回の検討のような臨床微生物学的解析を行うことで、感染経路の推定を行い ICT へ情報提供することは感染対策上非常に重要であると思われる。

文 献

- 1) 松村久美, 高橋あずさ, 坂田 宏. 1999. NICU に入院した低出生体重児におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出状況. 環境感染 14(3): 189-191.
- 2) 志村浩二, 臼倉幸宏, 五十嵐健康, 他. 1999. 新生児感染症の実態調査. 厚生省心身障害研究 新生児期の疾患とケアに関する研究. 平成 9 年度研究報告書 23.
- 2) 高橋尚人. 2001. 新生児 TSS 様発疹症 NTED—細菌性スーパー抗原による新しい疾患—. 日本小児科学会雑誌 105: 1149-1155.
- 2) 高橋尚人, 仁志田博司, 猪野雅孝, 他. 1995. 原因不明の早期新生児発疹症. 日本新生児学会誌 31: 371-377.
- 5) 岡田隆滋, 古川正強, 牛田美幸. 1998. 毒素産生 MRSA による新たな新生児発疹性疾患 四国の疫学調査, 分離菌の生物学的性状, 院内感染予防対策について. 小児感染免疫 10: 97-103.
- 6) Takahashi, N., H. Nishida. 1997. A new exanthematous disease with thrombocytopenia in newborn infants. Arch. Dis. Child 77: F79.
- 7) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. 1997. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 18: 306-309.
- 8) 佐藤延子, 安部裕子, 石井恵子, 他. 2002. NICU における MRSA キャリア化防止対策とムピロシン耐性について. 環境感染 17(3): 250-256.
- 9) 伊藤重彦, 大江宣春, 草場恵子, 他. 2002. 病院職員の MRSA 鼻腔内保菌率調査とムピロシンによる除菌. 環境感染 17(3): 285-284.
- 10) Mitsuda, T., K. Arai, M. Ibe, et al. 1999. The influence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers in a nursery and transmission of MRSA to their households. J. Hosp. Infect. 42: 45-51.
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard M7-A5, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- 12) Fujino, T., N. Mori, A. Kawana, et al. 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Tokyo Hospital in 2000. Jpn. J. Infect. Dis. 54: 91-93.
- 13) Kawano, F., H. Miyazaki, J. Takami, et al. 2002. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Kumamoto Hospital in 2001. Jpn. J. Infect. Dis. 55: 29-30.
- 14) 竹村ひとみ, 土井まつ子, 菅野泰友, 他. 2002. 新生児・未熟児室から分離されたブドウ球菌の疫学的解析. 環境感染 17(3): 257-263.
- 15) 小池直人, 渡邊好文, 名和 肇. 1997. 鼻腔内メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の検出における綿棒擦過法と MRSA スクリーニング用培地法との比較検討. 臨床と微生物 24(5): 607-611.
- 16) Reagan, D. R., B. N. Doebbeling, M. A. Pfaller, et al. 1991. Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. Ann. Intern. Med. 114(2): 101-106.
- 17) 升田隆雄, 坂口啓二, 竹内光治, 他. 1994. 医療従事者における MRSA 保菌に関する問題点. IRYO 48(4): 263-268.
- 18) 大城 誠, 高橋理栄子, 西川 浩, 他. 1998. 新生児集中治療室におけるメチシリン耐性黄色ブドウ

- 球菌保菌児の減少 手袋の着用. 日本小児科学会雑誌 102(11): 1171-1175.
- 19) 長谷川 功, 徳田幸子, 羽田 聡, 他. 2001. 当院 NICU におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 対策の検討 ディスポ手袋着用の効果. 日本新生児学会雑誌 37(3): 474-478.
- 20) 河井昌彦, 儘田光和, 丹羽房子, 他. 2003. 新生児集中治療室におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌対策としてのディスポ手袋着用の有用性. 周産期医学 33(12): 1537-1539.
- 21) 伊藤玲子, 満田年宏, 森 雅亮, 他. 2000. 小児科病棟における耐性ブドウ球菌伝播様式のパルスフィールド電気泳動法による分子疫学的解析. 日本小児科学会雑誌 104(8): 851-855.

The Analysis of MRSA Strains by PFGE and the Infection Control Strategies in NICU

Makiko Kiyosuke,¹⁾ Kazuo Sato,²⁾ Masato Seki,²⁾ Megumi Takayanagi,³⁾
 Zenzo Nagasawa,^{3), 4)} Akira Koguchi,⁴⁾ Ariaki Nagayama⁴⁾

¹⁾ Department of Clinical Laboratory, Clinical Research Institute,
 National Hospital Organization Kyushu Medical Center

²⁾ Department of Pediatrics, National Hospital Organization Kyushu Medical Center

³⁾ Department of Laboratory, Saga Medical School Hospital

⁴⁾ Department of Immunology and Microbiology, School of Medicine, Fukuoka University

In National Kyushu Medical Center, almost half of the new patients carrying MRSA were detected from the babies hospitalized in neonatal intensive care unit (NICU), and MRSA was one of the most important pathogens for nosocomial infection in the NICU. For epidemiologic survey, we analyzed the genotype of 62 MRSA strains isolated between December 1999 and May 2002 in the NICU using pulsed field gel electrophoresis. The examined strains were consequently classified into 11 groups and an epidemic period due to type G, which was the most frequently isolated genotype, was observed in 2000. Furthermore, we attempted to detect MRSA from the environment of NICU and the nasal cavities of NIU staffs. MRSA strains were isolated from the surrounding of the patients and some of the staff's nasal cavities. The genotype analysis of these strains with PFGE revealed that all of them were identified type G. These results suggest that the environment of the patient was contaminated with MRSA when the outbreak due to MRSA was occurred. Therefore, we organized Infection Control Team in NICU and took precautions against nosocomial infections. The isolation rate of MRSA was dramatically decreased after the introduction of the precautions. We believed that the most effective precaution for the prevention of contact infection was the wear of gloves when we care for the patients.