

[原 著]

POT 法で解明された当院新生児センターにおける methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) アウトブレイクの伝播様式

山田貴子¹⁾・杉浦康行¹⁾・奥平正美¹⁾・稲富里絵¹⁾・巽 則雄¹⁾
磯部貴子¹⁾・原 徹¹⁾・岡村武彦¹⁾・犬塚和久²⁾・鈴木匡弘³⁾

¹⁾ 安城更生病院 Infection Control Team

²⁾ 愛知県厚生連医療事業部

³⁾ 愛知県衛生研究所生物学部細菌研究室

(平成 27 年 12 月 28 日受付, 平成 28 年 6 月 2 日受理)

当院新生児センターでは感染管理のために, 入院時には咽頭, 胃液, 耳孔, 入院後は週一回の鼻腔を対象とした methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の監視培養を実施しており, 月に 1~2 件の新規発生 MRSA が検出される状況であった。今回, 2011 年に 5 ヶ月間で計 19 名の患児より新規に MRSA が検出されるアウトブレイク事例を経験した。同時期に検出された新生児センター以外の小児科由来株を含めた伝播経路の検討を行った。

アウトブレイクが発生した 2011 年の 5 ヶ月間に検出された新規発生 MRSA 55 株 (新生児センター 19 株, 小児病棟 2 株, 小児科外来 34 株) を対象とし PCR-based open reading frame typing (POT) 法を実施した。あわせて表皮剥離毒素 exfoliative toxin (ET-A, ET-B) 遺伝子検出も行い, 患者移動情報とあわせて解析した。

POT 法によって 55 株はグループ A から F の 6 グループと散発例に分類された。新生児センターの 19 株のうち, 13 株がグループ A (POT 型 73-158-122, ET-B 陽性) に分類され, 速乾性手指消毒剤の使用量に大きな変動がないにもかかわらず, 特に 5 ヶ月目に新規発生数を多く認めた。解析結果より, MRSA 保菌患児とベッドが隣接している患児から同一クローンが検出されており, 水平伝播が疑われた。

POT 法を用いた分子疫学的解析により水平伝播が証明され, 職員の意識が高まり, 終息に繋がったと考えられた。

Key words: PCR-based ORF typing 法, MRSA, outbreak

序 文

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) は, 皮膚軟部組織感染症や肺炎など化膿性病変を形成するほか, 外毒素により様々な病態を引き起こす。外毒素にはトキシックショックを引き起こす Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1), エンテロトキシ

ンや, staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) を引き起こす表皮剥離毒素 exfoliative toxin (ET-A, ET-B) などが存在する。

本菌は, 病院内の免疫学的弱者, 未熟児, 新生児などに致死的な感染を引き起こすことから院内感染対策上重要な菌である^{1)~3)}。特に, 低出生体重児は血球貪食殺菌系の未熟性, 多核白血球の chemotaxis の低下, オプソニン化の不足, 免疫グロブリンの低値などにより免疫力が低いため, 本菌の管理が重要とされている。このような低出生体重児の多い新生児センターでは積極的監視培養を実施することにより速やかに保菌者を確認して, 標準予防策に加え必要に応じた感染経路別予防策を講じる必要がある⁴⁾。

著者連絡先: (〒446-8602) 愛知県安城市安城町東広畔 28
安城更生病院
山田貴子
TEL: 0566-75-2111 (内線: 2451)
FAX: 0566-76-4335
E-mail: takadaa@kosei.anjo.aichi.jp

PCR-based open reading frame typing (POT) 法は、院内において黄色ブドウ球菌、特に MRSA の集団感染が疑われた際、容易に分子疫学解析を実施可能とすることを目的として開発された。POT1, POT2, POT3 から構成される 3 つの数値により分類され、同一株の場合はそれぞれの数値がすべて一致することから、数値より大まかに MRSA クローンが推定できる⁵⁾。一方、POT2 と POT3 の数値の組み合わせによって株レベルでの遺伝子型決定を行う。

今回、当院新生児センターにおいて、2011 年の 5 ヶ月間に、19 名の患児から MRSA が検出されるアウトブレイク事例を経験した。検出された MRSA 19 株について POT 法を用いて解析した。POT 法による分子疫学解析とともに、環境検査、職員鼻腔 MRSA 保菌調査、ベッド移動情報等を総合的に判断して感染経路を推測し、医療スタッフの感染対策に対する意識が高まったことによりアウトブレイク終息につながったと考えられた事例を経験したので報告する。

材料と方法

1. 対象

当院小児科において 2011 年の 5 ヶ月間に新規で検出した MRSA 55 株を対象とした。内訳は新生児センター (NICU, GCU) 19 株、小児科病棟 2 株、小児科外来 34 株であった。同一患者から複数回検出された場合は重複を避けるために、初回分離株のみを対象とした。なお、MRSA の同定検査は、栄研化学のマンニット食塩培地を基に作製した自家調製食塩卵黄培地、及びポアメディア MRSA 分離培地 II (栄研化学) を用い、37℃、24 時間及び 48 時間に判定した。薬剤感受性は Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) の判定基準 (Document M100-S19) に基づいて判断した。

2. 遺伝子解析

POT 法による遺伝子型解析は Cica Geneus Staph POT kit (関東化学) を用い、添付文書に従って実施した。POT 法の分類は鈴木らの報告を参考に遺伝子型を決定した⁵⁾。

ET 遺伝子検出はプライマーとして op_etaf GGAA TAAGTACTATGGTGTCATGC, op_etar CAAG ATGAGACACTTTGCTAGAA (eta 遺伝子検出, 612 bp), および op_etbf AAGCAGCCAA AAACCCATC G, op_etbr CCCCCAAGTGTCTCCAAAAG (etb 遺伝子検出 500 bp) を用い、マルチプレックス PCR を行った。PCR 反応液は Ex Taq hot start version (タ

カラバイオ) を用い、Mg²⁺ 3 mM, Taq polymerase 0.5 unit, プライマー各 0.2 μM の条件で、反応液量を 20 μL として実施した。PCR 反応は 95℃ 3 分に引き続き、94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 2 分を 30 サイクル実施した。電気泳動は POT 法と同じ条件で実施した。

なお、POT 法、ET 遺伝子検出ともに愛知県衛生研究所細菌研究室で解析を実施した。

3. 環境調査、職員鼻腔培養検査

環境を介した伝播を疑い、MRSA 感染患児が入院していたベッド及びその周辺、医療従事者の高頻度接触部位を中心に 40 ヶ所の環境培養調査を行った。さらに、医療スタッフの保菌による水平感染を疑い、新生児センター内に従事する医師 17 名、看護師 82 名、その他メディカルスタッフ 11 名の計 110 名の鼻腔 MRSA 培養調査を行った。なお、鼻腔培養の検体採取は、基本的には両側施行が正しいと思われたが、現場に依頼したため両側、片側の指定はしなかった。検査方法は、滅菌綿棒を湿らせてふき取ることで採取し、血液寒天培地、自家調整食塩卵黄培地、ポアメディア MRSA 分離培地 II (栄研化学) を用いて 37℃、24 時間及び 48 時間に判定を行った。

4. 感染経路の解析

遺伝子解析と環境調査、鼻腔培養検査、患者移動情報を総合的に判断して感染経路を解析した。

結 果

1. 遺伝子解析

POT 法で得た小児科由来 MRSA 55 株の結果をもとに、同一 POT 型株が 2 株以上検出されたグループ A (73-158-122), B (70-18-81), C (70-18-1), D (104-24-80), E (106-137-80), F (106-151-45) と同一 POT 型株が 1 株ずつのみの散発例に分類した。

新生児センターの 19 株のうち 13 株 (68.4%) はグループ A (73-158-122) に分類され、うち 11 株から ET-B が検出された。皮膚症状のある患児は 10 名であった。一方、小児科外来の 34 株のうち 10 株 (29.4%) がグループ B (70-18-81) に分類され、グループ B の 10 株すべてから ET-A が検出された (表 1)。

2. 環境調査、職員鼻腔培養検査

環境培養調査を 40 ヶ所について施行したが、すべての箇所から MRSA は検出されなかった。

職員鼻腔培養検査では、検査を実施した 110 名のうち看護師 2 名、メディカルスタッフ 1 名の計 3 名 (2.7%) より MRSA が検出された。職員鼻腔培養検査により 3 名から MRSA が検出されていたが、薬剤

表 1. 小児科由来株における POT 型および exfoliative toxin 陽性の株数

グループ	POT1	POT2	POT3	新生児センター	小児科病棟	小児科外来	計 (株)
A	73	158	122	13 (ETB : 11)	0	4	17
B	70	18	81	1	1	10 (ETA : 10)	12
C	70	18	1	2	0	2	4
D	104	24	80	0	0	2	2
E	106	137	80	0	0	2	2
F	106	151	45	2	0	0	2
散発例				1	1	14	16
計 (株)				19	2	34	55

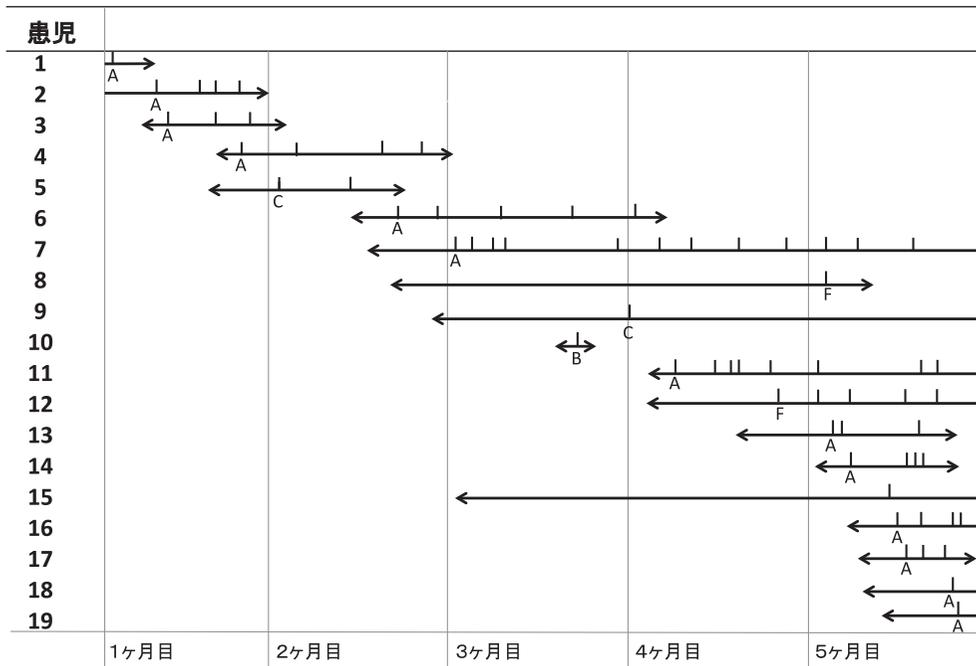


図 1. 新生児センターにおける MRSA19 株についての検出状況

縦軸に患児，横軸を時系列とし，入院期間を矢印，縦棒は MRSA の検出日を示して，POT 法で特定された型によるグループ A から F を表記した。なお，散発例にはグループ名を表記していない。

感受性パターンによる分類からグループ A と異なることを確認した。この結果から，感染対策を行う上で，スタッフ個々の心理的悪影響が起り得ることを懸念して，遺伝子型の特定は実施しなかった。

3. 感染経路の解析

新生児センターにおける MRSA19 株についての検出状況を図に示す (図 1)。グループ A は調査開始から 1 ヶ月目と 5 ヶ月目に新規発生数が多くみられた。MRSA の新規発生が特に多かった 5 ヶ月目のグループ A の検出状況を明らかにするために，病棟ベッド

配置図と患児のベッド移動情報を検討した (図 2, 図 3)。図 3 より，患児②から患児④，患児②から患児⑧，患児⑥から患児⑦，患児③から患児⑦，患児⑤から患児⑨の○で囲った少なくとも 5 ケ所の部分で，MRSA 保菌患児に隣接するベッドにいる患児に MRSA が発生し，水平伝搬していることが推察された。

考 察

今回，当院新生児センターで複数検出されたグループ A (73-158-122) と，小児科外来で多く認めたグルー

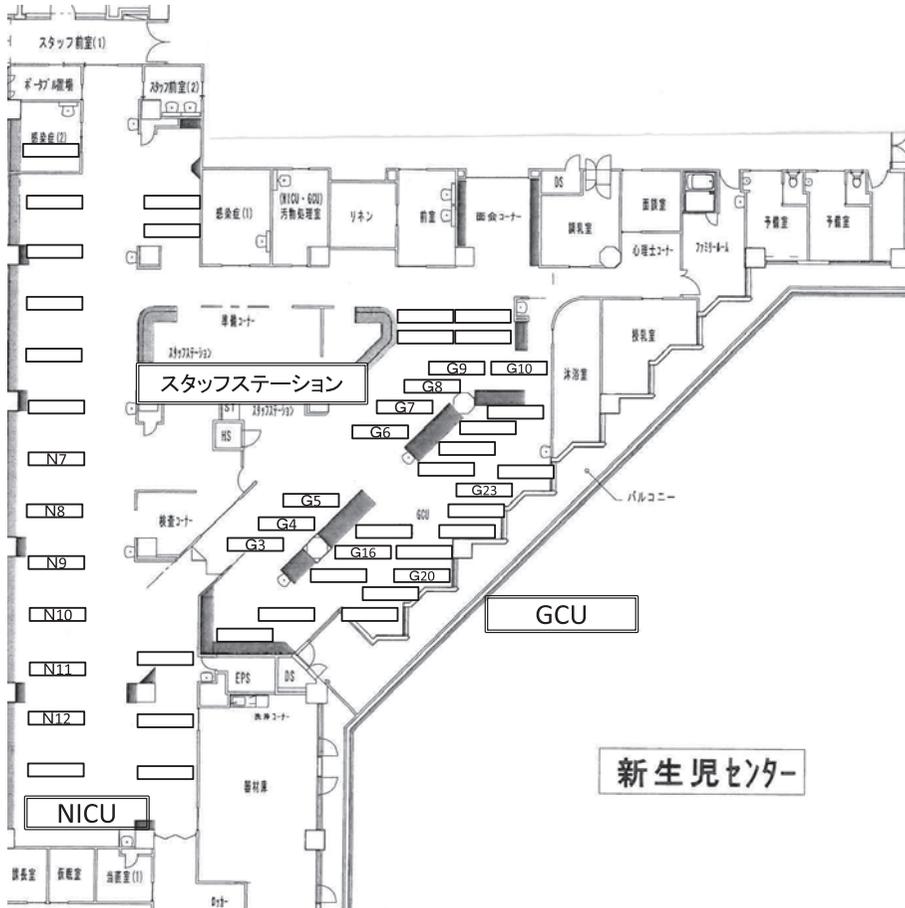


図2. 新生児センターベッド配置図

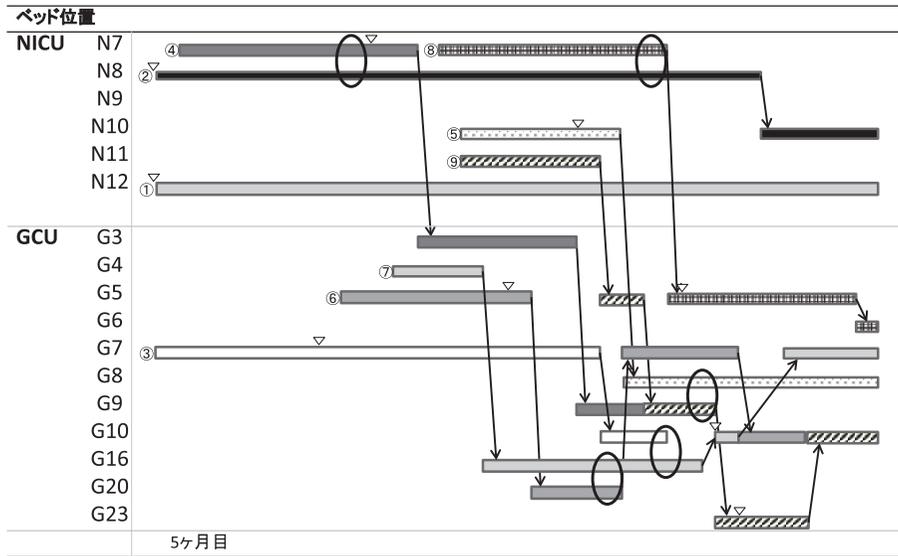
関連するベッドにはNICU：N，GCU：Gに加え，番号を記入した

プB (70-18-81) は異なるクローン型であったことより，外来流行株が新生児センターで蔓延したことは否定的であった。

鈴木ら⁵⁾によれば，POT1の値によってMLST解析で得られるST型のうち近縁なものをもとめたclonal complex (CC)型とstaphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)型の推定が可能である。新生児センターで複数検出されたグループAのPOT型はPOT1：73であり，CC：89，SCC*mec* type IIと推定された。また，POT1：73はET-B産生の小児流行クローンが多いとされている。今回の調査でも，新生児センターで検出されたPOT1：73を示す13株のうち11株がET-B遺伝子を保有しており，このET-Bによる皮膚感染症の発症症例を複数認めた。Yamasakiら⁷⁾は，ET-B遺伝子はplasmid上に存在し，抗ET-B抗

体が1～3歳児で少ないことからSSSSを発症する可能性がある」と述べている。江頭ら⁸⁾もNICUで発症したSSSS 2症例について，遺伝子解析を行っている。その結果，ET-Bが産生されており，各種菌毒素遺伝子の検出パターン結果から同一ゲノムタイプであったと報告している。今回のアウトブレイクが終息までに時間を要した原因として，剥離した皮膚により医療従事者や環境が汚染され続けた結果，感染対策に難渋したことが予想された。

新生児センターにおけるMRSA伝播は，感染患児を中心とした周辺の環境汚染を介して起こるとする報告がされている²⁾⁶⁾。今回の調査では，環境培養調査でMRSAが検出された箇所は見られず，感染源を特定し得なかった。調査箇所の不足，あるいは調査前に清掃をしていたことにより，除菌された可能性も考えら



注)1患者1色コードとし、ベッドの移動は矢印で結んだ

図3. 5ヶ月目におけるベッド位置とグループA検出との関連性

病棟ベッドの位置として縦軸に、時系列を横軸として再構築した図を作製し、患児ごとに各々識別して、ベッド間の移動を矢印で結んだ。各患児における初回MRSA検出ポイントを▽として図内に示した。

れた。牧野ら⁹⁾も、清拭回数を増加させることで、環境汚染を減少できると報告しており、早期にPOT法による解析を行っていけばより早い時期の終息が可能であったものと考えられる。

環境調査、職員鼻腔培養検査より、医療従事者による接触感染を疑う明確な感染源は認められなかった。しかし、POT法を行ったことにより、同一クローンの伝播で起こる水平感染であったことが証明され、MRSA感染患児のベッド周辺に連続して発生したことが推測された。これらの結果より、特定の要因ではなく、スタッフの感染対策への意識低下や、手指消毒の不足、環境清拭回数の少なさなども要因であった可能性が示唆された。

当院にはPOT法を実施できる設備が整っていないため、1ヶ月目の3例目発生時から薬剤感受性パターンによる分類を行い、アウトブレイク情報を臨床へフィードバックしていた。しかし、根拠に乏しく積極的な介入をすることができなかった。そこで、5ヶ月目の後半にPOT法実施の依頼を行い、翌々日には結果を臨床へ報告した。このPOT法の結果が分子疫学的根拠となり医療スタッフの感染対策への意識を高めることに繋がった。

森山ら¹⁰⁾の研究によると、POT法はパルスフィールド電気泳動法(PFGE)と比較して、簡便迅速

で再現性も良く、泳動後のバンドの有無を元に結果を数値化できることから、菌株間の比較やデータの管理に極めて有用であると言われている。今回POT法を行ったことにより分子疫学的結果が迅速に得られ、アウトブレイクの伝播様式が水平感染であった可能性が強く示唆され、医療スタッフの接触感染に対する意識が向上したことによって終息したものと推測された。

なお、以前より耐性菌サーベイランスを三河地区全体で取り組み、毎年報告会を開催して、情報の共有に取り組んでいる。また、2012年より、感染防止対策加算制度が導入され、連携活動の情報共有が各地で行われている。愛知県においては、アウトブレイクなどの問題が発生した場合の改善支援を目的とした活動が活発に行われ、参加施設及びその連携施設でアウトブレイクが発生し、対応が困難な場合には、改善支援を行うネットワークが確立している。今回の内容についても、情報提供をこれらの報告会で行い、感染対策の向上に努めている。

文 献

- 1) 横田俊平, 今川智之, 片倉茂樹, 他. 1996. 皮膚剥脱素ET-B産生メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による熱傷様皮膚症候群の1例. 感染症誌 70: 206-210.
- 2) 清祐麻紀子, 佐藤和夫, 関 真人, 他. 2005. 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. 日臨徴誌 15: 25-31.
- 3) 荒川宣親. IDWR 感染症発生動向調査週報 感染症の話 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症. 国立感染症研究所. http://idsc.nih.gov.jp/idwr/kansen/k02_g1/k02_18.html. 2015 年 7 月 17 日現在.
- 4) Bellanti, J.A. 1994. Immunology. p. 1000-1028, In: Neonatology (G.B. Avery ed., 4th ed.), Lippincott, Philadelphia.
- 5) 鈴木匡弘. 2011. Cica Geneus Staph POT Kit の原理とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学. THE CHEMICAL TIMES 221: 16-21.
- 6) 武井 泰, 田爪正氣, 松木秀明, 他. 2006. NICU の環境中におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学解析. 東海大学健康科学部紀要 12: 27-31.
- 7) Yamasaki, O, T Yamaguchi, M Sugai, et al. 2005. Clinical manifestations of staphylococcal scaladed-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. J Clin Microbiol. 43: 1890-1893.
- 8) 江頭昌典, 田川正人, 平湯洋一, 他. 2008. NICU 内での水平感染が遺伝子解析で証明しえたブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群の 2 症例. 感染症学雑誌 82: 34-37.
- 9) 牧野恵津子, 小池良且, 小原知美, 他. 2012. ATP 測定法による環境汚染度の評価と清拭回数の増加に伴う効果について. 日本環境感染学会誌 27 (Sup): 240.

An investigation of the transmission pathway of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a newborn center by using the pcr-based open-reading frame typing procedure

Takako Yamada¹⁾, Yasuyuki Sugiura¹⁾, Masami Okudaira¹⁾, Rie Inatomi¹⁾, Norio Tatumi¹⁾, Takako Isobe¹⁾, Toru Hara¹⁾, Takehiko Okamura¹⁾, Kazuhisa Inuzuka²⁾, Masahiro Suzuki³⁾

¹⁾Infection Control Team Anjo Kosei Hospital

²⁾Medical Operation Division Aichi Prefectural Welfare Federation of Agricultural Cooperatives

³⁾Laboratory of Bacteriology, Aichi Prefectural Institute of Public Health

In our newborn center, we are performing active surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) for infection control. An outbreak of MRSA among 19 infant patients was occurred in our hospital during a 5-month period in 2011. We analyzed 55 MRSA strains collected from patient samples by using the phage open-reading frame typing method (POT), as well as the exfoliative toxin (ET) gene detection, and the clinical epidemiological method to determine the spread pattern. The specimens were classified into groups A-J and the sporadic cases based on the POT results. Including the child who was hospitalized long-term, group A had been infected continuously since the examination period or before. Especially, MRSA strains belonging to group A were detected between April and August most frequently. Moreover, as a result of investigating a patients' transference histories, we discovered that infants in the adjoining patients with MRSA infection had been newly diagnosed with MRSA. Therefore, we were able to trace the transmission pathway and stop the outbreak. Our results suggest that the molecular epidemiology method i.e. the POT procedure is useful from the standpoint of infection control.