

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08837

研究課題名(和文)カルバペネム耐性腸内細菌感染症の効果的感染対策の確立及び新規治療標的の解析

研究課題名(英文)Effective infection control procedures and new therapeutic target for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae

研究代表者

貫井 陽子 (NUKUI, Yoko)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20568232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：国内におけるCRE感染症の疫学、細菌学的特徴、耐性機構の解明を行った。腸内細菌科細菌27,956株の内、大腸菌の0.21%、クレブシエラ属の5.0%、セラチア属の7.0%、エンテロバクター属の10.8%がCREの定義を満たし、これまでの国内の報告と比し高率であった。また検出部位は尿、呼吸器系検体が多く、水平伝播防止のために標準予防策の遵守に加え、接触予防策が必要と考えられた。また今回検出されたCREの内、新型のカルバペネマーゼ候補が6株認められ、69番・238番のシステイン変異が重要であることが示唆され、新たな治療標的候補と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The historical trends of increasing prevalence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) and the evolution of CRE strain types within hospital and community settings suggest that clinical issues with this pathogen will continue in the future.

Our results showed increasing prevalence of CRE in Japanese hospital. CRE was frequently detected in urine and sputum samples. Therefore, for the prevention of CRE transmission, implementing contact precaution procedures is a vital control method, along with the conventional hand hygiene practices. In addition, our results showed the new therapeutic target of CRE.

研究分野：感染制御学

キーワード：耐性菌 感染対策

1. 研究開始当初の背景

カルバペネム系抗菌薬はグラム陰性桿菌による感染症治療の「最後の切り札」として、临床上重要な抗菌薬である。しかし 2012 年の米国疾病センターの報告によると、過去 10 年間でカルバペネム耐性腸内細菌 (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) は 1.2% から 4.2% に増加し、特にクレブシエラ属では 1.6% から 10.4% と急増している。CRE は血液中に侵入するとエンドトキシンを産生し、ショックや多臓器不全を引き起こす。死亡率は 50% を超え、予後が非常に悪い感染症である。2013 年度厚生労働省院内感染対策サーベイランス統計によると国内の腸内細菌科全体における CRE の割合は 0.3% 程度と欧米と比較すると低率であると報告されている。しかし国内における CRE 感染症疫学の全容はいまだ明らかになっていない。有効な感染対策を構築することも急務であると考えられている。

また CRE にはカルバペネマーゼ (カルバペネムをはじめほぼ全てのラクタム系抗菌薬を加水分解する酵素) を産生する菌株 (Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: CPE) が含まれる。カルバペネマーゼは Ambler によって Class A-D の 4 種類に分類されている。従来、国内で多く報告されてきたのは Class B のメタロラクタマーゼであるが、近年欧米を中心に Class A の KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) 型酵素や Class D の OXA 型酵素など新型カルバペネマーゼの検出が数多く報告されているが、国内検出株における耐性機序の詳細な解析はなされていない。

CRE 感染症の最適な治療法は現時点で確立されていない。臨床ではその他の耐性菌感染症治療薬として使用されているコリスチン、アズトレオナム、チゲサイクリン、フォスフォマイシンなどの単独/併用療法が行われているが、十分な臨床効果は認められていない。また、腎機能低下や神経障害など重篤な副作用が比較的高頻度に出現することより、重篤な患者での使用は制限せざるを得ない。CRE 感染症の治療薬候補として、Class B のメタロラクタマーゼでは酵素の活性中心に亜鉛を有することから、キレート作用を有する EDTA-カルシウム製剤などの応用が進められている。一方、Class A, D 型の新型カルバペネマーゼについては活性中心にセリンを有しており、前述の Class B とは異なり、現時点において有効な治療候補は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では国内における CRE の疫学、細菌学的特徴、耐性機構の解明を行い、新規治

療標的の探索及び効果的な院内感染対策を構築することを目的とした。

本研究では以下の項目に焦点をあて解析を行った。

(1) CRE の疫学、リスク因子、伝播様式などの臨床的解析を行う

(2) CRE に対する最適な感染対策を確立する

(3) 新型カルバペネマーゼの解析及び新たな治療標的部位の検索を行う。

3. 研究の方法

(1) CRE の疫学、リスク因子、伝播経路の臨床解析

2004 年 4 月 1 日から 2013 年 3 月 31 日に東京大学医学部附属病院で分離された腸内細菌 (大腸菌、クレブシエラ属、セラチア属など) 27,956 株を対象とした。これらの中で CRE が検出された症例について、リスク因子の解析を行う。

(2) CRE に対する最適な感染対策の確立

(1) により CRE の細菌学的特徴を明らかにし、CRE に対する最適な感染対策を確立する。

(3) Class A, D 新型カルバペネマーゼの解析

(1) により明らかになった CRE 株を用いて、Class B 型のメタロラクタマーゼ及び既知の耐性遺伝子 (IMP-1, VIM-2, KPC, OXA-48, IMI) を有するものを遺伝子解析により除外し、新型カルバペネマーゼの検索を行う。また、新型カルバペネマーゼと既存の Class A, D 酵素の遺伝子配列情報の比較を行い、新型カルバペネマーゼに特徴的と考えられる遺伝子変異を検出する。

4. 研究成果

2004 年 4 月 1 日から 2013 年 3 月 31 日までの期間に検出された腸内細菌 (27,956 株) の内、大腸菌の 0.21%、クレブシエラ属の 1.4%、シトロバクター属の 5.0%、セラチア属の 7.0%、セラチア属の 7.7%、エンテロバクター属の 10.8% が CRE の定義を満たし、これまでの国内の報告と比べ高率であることが判明した。また検出部位は尿 32%、呼吸器系 30%、腹腔内 16%、創部 15%、血液 3%、血管内カテーテル 2%、生殖器系 2% であり、欧米の報告と比較すると尿、呼吸器系検体での検出が多い傾向が認められた。現在国内においても CRE による院内伝播・アウトブレイクの報告が増加している。これらを防止するために、尿・呼吸器系検体の取り扱い時には、標準予防策の遵守に加え、特に厳重な接触感染対策を行うことが必要と考えられた。

また、上記で判明した CRE の中で既知の耐性遺伝子 (IMP, VIM, KPC, NMCA, OXA, IMI, NDM) 保有株を遺伝子解析により除外したところ、Class A 型の KPC や D 型の OXA 型とシークエンス上の相関性が比較的高い新型のカルバペネマーゼ産生候補株が 6 株認められた。この 6 株に対して T7 ベクター-pET-26 を用い、大量発現系及び精製系を確立し、Class A 及び D 型カルバペネマーゼとの配列情報を比較したところ、69 番目と 238 番目のシステイン変異が重要であること、またジスルフィド結合が関与している可能性が示唆され、新たな治療標的候補と考えられた。

今後はマウス敗血症モデルを使用し、野生型及び新型カルバペネマーゼ変異株の病原性解析を実施し、in vivo での役割を明らかにし、新たな治療薬開発につなげる。

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 11 件)

Toba M, Nukui Y et al. Prevention of surgical site infection via antibiotic administration according to guidelines after gynecological surgery. J Obstet Gynecology. 2018 in press. DOI: 10.1111/jog.13714. 査読有

Ogihara S, Nukui Y et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of PCR-based open reading frame typing, multilocus sequence typing, and *Staphylococcus* protein A gene typing. J Infect Chemother. 2018; 24(4):312-314. DOI:10.1016/j.jac.2017.10.023. 査読有

Chino T, Nukui Y, Morishita Y, Moriya K. Morphological bactericidal fast-acting effects of peracetic acid, a high-level disinfectant, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in tubing. Antimicrob Resist Infect Control. 2017; 6: 122-125. DOI: 10.1186/s13756-017-0281-1. 査読有

Hatakeyama S, Ohama Y, Okazaki M, Nukui Y, Moriya K. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan. BMC Infect Dis. 2017; 17: 197-199. DOI: 10.1186/s12879-017-2298-8. 査読有

貫井 陽子、世界的に警戒が必要なカルバペネム耐性腸内細菌科細菌、Medical Practice、査読無、34 巻、2017 年、453-455.

貫井 陽子、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌、小児臨床、査読無、1 巻、2017 年、123-126.

貫井 陽子、サイトメガロウイルス感染症、エキスパートの臨床知による検査学ハンドブック、査読無、1 巻、2017 年、232-235.

貫井 陽子、蚊媒介ウイルス感染症の職業感染事例から学ぶ標準予防策の重要性、Ignazzo、査読無、2017 年、9-10.

Igawa G, Nukui Y et al. Comparison of agar dilution and broth microdilution methods for *Clostridium difficile* antimicrobial susceptibility testing. J Glob Antimicrob Resist. 2016; 7: 43-45. DOI: 0.1016/j.jgar.2016.07.007. 査読有

貫井 陽子、医療従事者への予防接種、抗体管理、小児感染対策マニュアル、査読無、1 巻、2015 年、31-35.

貫井 陽子、病院・診療所における季節性インフルエンザ対策の在り方と課題、化学療法の領域、査読無、31 巻、2015 年、31-35.

[学会発表](計 24 件)

Nukui Y. Molecular epidemiology and clinical analysis of *Clostridium difficile* outbreak in Japan. American Society of Microbiology Microbe 2018.

貫井 陽子、*Clostridium difficile* アウトブレイクの分子疫学的解析、第 92 回日本感染症学会総会学術講演会 2018.

貫井 陽子、CRE up to date、第 34 回日本環境感染学会総会 2018.

Nukui Y. Molecular epidemiology and clinical analysis of *Helicobacter cinaedi* bacteremia in Japan. American Society of Microbiology Microbe 2017.

Chino T, Nukui Y. Morphological bactericidal fast-acting effects of peracetic acid a high-level disinfectant against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in tubing. American Society of Microbiology Microbe 2017.

Ogihara S, Nukui Y. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of PCR-based open reading frame typing, multilocus sequence typing, and *Staphylococcus* protein A gene typing. American Society of Microbiology

Microbe 2017.

貫井 陽子、 *Helicobacter cianedi* 菌血症の分子疫学的解析、第 91 回日本感染症学会総会学術講演会 2017.

貫井 陽子、蚊媒介感染症（病院対応）、第 90 回 ICD 講習会 2017.

Nukui Y. Clinical and bacterial characterization of nosocomial *Clostridium difficile* infection among children in Japan. American Society of Microbiology Microbe 2016.

貫井 陽子、培養結果をもとにした蓄尿検査適正化への取り組み、第 31 回日本環境感染学会総会 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貫井 陽子 (NUKUI, Yoko) 東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20568232