

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09931

研究課題名(和文)カルバペネム耐性E. cloacaeの薬剤耐性機序と分子疫学に関する研究

研究課題名(英文)Molecular epidemiology and resistance mechanism of carbapenem-resistant Enterobacter cloacae

研究代表者

八木 哲也(Yagi, Tetsuya)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70333573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2012-16年に名大病院で検出されたカルバペネム耐性E. cloacae complex (ECC) 39株中20株がカルバペネマーゼ産生菌(CPE)であった。分子疫学的解析では、CPEのST53(6株)、ST113(7株)、ST513(2株)が遺伝的に近縁であった。CPE 7株のプラスミド解析では、全てIMP-1遺伝子を含むクラスI型インテグロンの入ったIncHI2A型の構造の類似したプラスミドであった。2014-16年に愛知県の24施設から収集したCPE疑いのECC82菌株の解析では、4施設から18株のCPEを認めた。全てIMP-1産生株で、同じ施設内では同じST型の株が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国でカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の中で、最も検出の多いE. cloacae complexでのCPEの疫学を明らかにした。CPEの方が非産生菌より施設内で水平伝播しやすいことが初めて示唆された。分子疫学的解析では、これまでに報告のあるSTとは異なるSTの株も見出され、STが異なっても、構造が類似したIMP-1遺伝子のあるクラスIインテグロンを持つIncHI2Aプラスミドを持っていることが明らかになった。愛知県下の多施設連携サーベイランスでもCPEは検出されていたが、施設を超えたクローンの伝播は見られなかった。菌の分子疫学的解析を含めた地域連携サーベイランスの重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Thirty-nine carbapenem-resistant Enterobacter cloacae complex (CRECC) isolates recovered in Nagoya University Hospital from 2012 to 2016. Twenty out of 39 CRECC were carbapenemase-producing (CP) ECC. Molecular epidemiologic analysis with MLST and Rep-PCR showed ST53 (6 strains), ST113 (7 strains), ST513 (2 strains) among CPE strains were genetically closely-related. Whole genome sequencing analysis of plasmids from seven representative CPE strains revealed that they all had similar structure of plasmid with class I integron containing IMP-1 gene and IncHI2A replicon type. Eighty-two ECC isolates, which were suspected to produce carbapenemase, were collected from 24 hospitals participated in an regional network in Aichi prefecture from 2014 to 2016. Eighteen out of 82 isolates, which were recovered from 4 hospitals, were shown to be IMP-1 producers. MLST analysis revealed that CPECC isolates with same ST were identified in the specific hospitals, and rarely seen beyond one hospital.

研究分野：感染症、感染対策

キーワード：カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 Enterobacter cloacae IMP-1 インテグロン IncHI2A

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌科細菌にカルバペネム耐性 (CRE) 及びカルバペネマーゼ産生菌 (CPE) が検出され、さらに世界での拡散が指摘され、多剤耐性菌の問題は世界的な公衆衛生上の大きな問題となっている。2015 年に発出された WHO の Global action plan を受けて我が国でも薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランが発出されようとしていた。我が国では 2014 年 9 月に CRE のサーベイランスの定義 (IPM/CS \geq 2mg/ml, かつ CMZ \geq 64mg/ml、または MEPM \geq 2mg/ml) が決定され、感染症法上の第 5 類感染症全数報告対象として、全国サーベイランスが開始されていた。そのサーベイランス開始当初の集計結果では、CRE として *Enterobacter* 属菌が多く、その中でも *E. cloacae* complex にはカルバペネマーゼ産生菌も多くみられ、*Enterobacter* 属の菌は院内感染症の原因菌としての重要性が高く、薬剤耐性の問題が今後ますます大きくなっていくことが予想された。CRE の疫学、検出、感染対策、治療についての研究報告は多くみられるが、それらは欧米からの報告がほとんどで、欧米で検出頻度の高い KPC 型や NDM-1 型、VIM 型、OXA 型 β -ラクタマーゼ産生の *Klebsiella* や *E. coli* の報告が多く、*Enterobacter* 属のものは非常に少ない。一方我が国ではカルバペネマーゼは IMP 型が最も多いとされ、欧米とは異なる疫学を示し、我が国での解析が期待される場所であった。

2. 研究の目的

上記のような背景から、*Enterobacter* 属特にカルバペネム耐性 *E. cloacae* complex の疫学や耐性機序などを明らかにすることは、我が国においてはもちろん世界的に見ても、学術上も感染対策上も有用な情報を提供すると考えられた。そこで本研究では 3 年間で以下の 3 点について明らかにすることを目的とした。

(1) 名古屋大学医学部附属病院 (以下名大病院) で分離されるカルバペネム耐性 *E. cloacae* complex (CRECC) 特にカルバペネマーゼ産生菌 (CPECC) のカルバペネム耐性機序と分子疫学

名大病院で検出された CRECC について、特に感染対策上より重要なカルバペネマーゼ産生が認められる CPECC について、その産生しているカルバペネマーゼの種類を解析する。また CRECC 株の分子疫学解析を行う。

(2) 名大病院における CRECC 検出のリスクファクター

名大病院において CRECC が検出された患者のなかで、CPECC とカルバペネマーゼ非産生株が分離された患者の背景を比較して、CPECC 検出の臨床的リスクファクターを明らかにする。

(3) 名大病院も含む愛知県下の医療施設で分離される CRECC の耐性機序と分子疫学

地域連携サーベイランスにおいて検出された、CRECC について耐性機序と分子疫学を上記と同様の方法で解析し明らかにする。サーベイランスで収集された CPECC 株と名大病院で検出された CPECC 株とを合わせて、菌のもつプラスミド遺伝子解析し、カルバペネマーゼ遺伝子周辺の遺伝構造と耐性菌及びプラスミドの地域での拡がりを明らかにする。

3. 研究の方法

研究組織としては、名大病院中央感染制御部の医師と、薬剤部の薬剤師が協力して遂行する。Whole Genome Sequencing 法については、技術的支援を国立感染症研究所にお願いする形で行った。

(1) 名大病院で 2012 年から 2016 年に検出された CRECC39 株について、各種 β -ラクタマーゼ阻害薬を用いた表現型検査である Disk-Synergy-Test を用いて、産生されるカルバペネマーゼを含む β -ラクタマーゼのクラスを確認した。ECC の亜種同定は、*hsp60* 遺伝子のシークエンス法で決定した。カルバペネマーゼ産生が疑われた株では、PCR 法にてクラス A の KPC 型、メタロ- β -ラクタマーゼでは IMP 型、VIM 型、NDM 型をクラス D では OXA 型のカルバペネマーゼ遺伝子を検索する。菌の分子疫学的解析は、Rep-PCR 法に基づいた DiversiLab 法と MLST 法で解析した。

(2) 上記の期間に CRECC が分離された患者のなかで、CPECC とカルバペネマーゼ非産生株が分離された患者の背景を比較して、CPECC 検出の臨床的リスクファクターを探索した。統計的解析は、EZR を用いて行い、カテゴリー変数では、Fisher の正確確率検定を、連続変数では Mann-Whitney 法で解析し、p 値が <0.05 で有意差ありとした。

(3) 2015 年から 2017 年のそれぞれ 1-3 月に愛知県下の 24 施設で検出された下記の条件を満たす CPE 疑いの分離株について解析した。

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* では、

CTX or CAZ 耐性かつ CMZ or FMOX 耐性

CTX or CAZ r 耐性かつ IPM or MEPM MIC 2 μ g/ml

Enterobacter cloacae complex and *Klebsiella aerogenes* では、

CTX or CAZ 耐性かつ CFPM or CZOP or CPR 耐性

CTX or CAZ r 耐性かつ IPM or MEPM MIC 2 μ g/ml

CPE かどうかの解析、賛成するカルバペネマーゼの遺伝子は上記の方法で、分子疫学的解析では MLST を用いて行った。

名大病院で検出された代表 CPECC 株 (MLST などの結果を参考に選出) 及び地域連携で

検出された代表 CPECC 株（各施設ごと ST 型ごと年ごとに選択）のプラスミドを WGS 法にて解析した。

4. 研究成果

(1) 名大病院で検出された CRECC39 株（うち 20 株は CPECC）の解析では、CPECC は全て IMP-1 産生であり、分子疫学的解析では、主な遺伝型のクラスターは全て CPECC で、genetic cluster III: ST78, xiii: ST113, *E. cloacae* subsp. *cloacae*: ST513, *E. asburiae*: ST53 に分類された（図 1）。

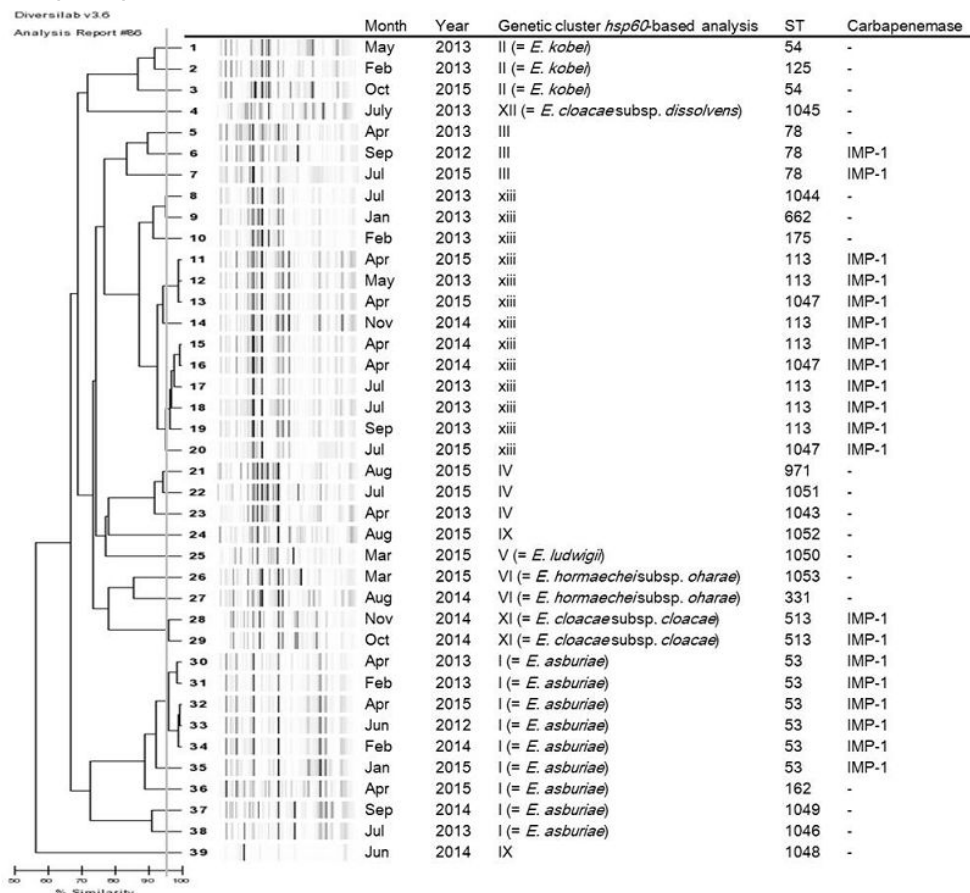


図 1

これら CPECC 株は non-CP の株と比べ、水平伝播しやすい傾向があると考えられた。

代表的な 7 株のプラスミドの全ゲノム解析では、7 株中 6 株のプラスミドは相同性が高く、IncHI2A replicon type をもち、IMP-1 遺伝子カセットを含む class I インテグロン構造を持っていた（図 2）。すなわち、CPECC の中では亜種が異なっても、構造上類似した薬剤耐性プラスミドを保有していることが分かった。

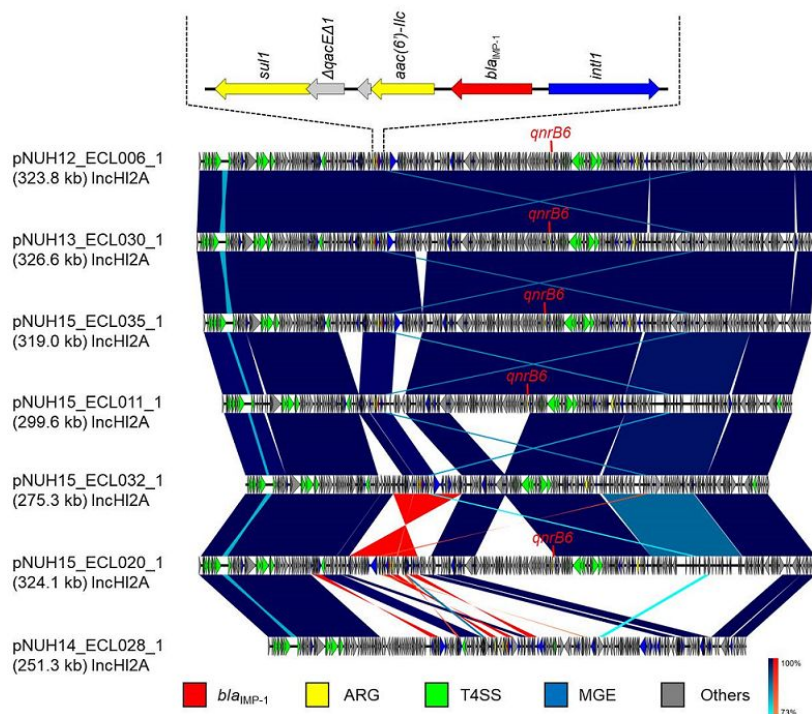


図 2

(2) CPECC が検出された 20 例と CP ではない CRECC が検出された 19 例の臨床的背景 (年齢、性別、基礎疾患、感染巣、入院期間等) を比較したところ、CPECC 検出患者の方が non-CP CRECC 検出患者と比べ、入院期間が長く (26.5 days vs 12 days, $p=0.0076$)、尿道カテーテル留置例が多く (60.0% vs 21.1%, $p=0.0225$)、気管内挿管例が多かった (60.0% vs 15.8%, $p=0.0079$)。これらの結果についてはまとめて現在投稿中である。

(3) 2015 年度から 2017 年度までに地域連携で収集された CPE 株は、年度別にそれぞれ 13、12、21 株で、腸内細菌科細菌中の割合は、0.13%、0.11%、0.18% で、検出率に著変は見られなかった。カルバペネマーゼ遺伝子は、IMP-1 が 46 株中 43 株、IMP-6 が 2 株、NDM-5 が 1 株検出された。CPECC はこのうち、5、5、8 株で、すべて IMP-1 産生株であった (図 3)。

No	Strains	PIPC/TAZ	CMZ	IPM	MEPM	Carbapenemase	ESBLs	AmpC
PN16-6	<i>K. pneumoniae</i>	≤16	32<	2<	2<	IMP-1	N.D	N.D
PN16-17	<i>K. oxytoca</i>	64<	32<	2	2<	IMP-1	N.D	N.D
PN16-18	<i>K. pneumoniae</i>	≤16	32<	≤1	2<	IMP-6	TEM, CTX-M-2	N.D
PN16-31	<i>E. coli</i>	≤16	32<	2	2<	IMP-1	N.D	N.D
PN16-32	<i>K. pneumoniae</i>	≤16	32<	≤1	2	IMP-1	N.D	N.D
PN16-40	<i>K. pneumoniae</i>	-	64≤	8	16≤	IMP-1	SHV, CTX-M-9	N.D
PN16-41	<i>K. pneumoniae</i>	-	64≤	8	16≤	IMP-1	SHV, CTX-M-9	N.D
PN16-42	<i>K. pneumoniae</i>	-	64≤	16≤	16≤	IMP-1	CTX-M-9	N.D
PN16-43	<i>K. pneumoniae</i>	4	32<	0.5	8	IMP-6	SHV, CTX-M-2	N.D
PN16-46	<i>K. pneumoniae</i>	≤8	16<	-	4	IMP-1	TEM	N.D
PN16-48	<i>E. cloacae</i> complex	32	16<	-	2	IMP-1	N.D	-
PN16-49	<i>K. pneumoniae</i>	≤8	16<	-	≤1	IMP-1	TEM	N.D
PN16-50	<i>K. pneumoniae</i>	≤8	16<	-	≤1	IMP-1	SHV, CTX-M-1	N.D
PN16-51	<i>E. cloacae</i> complex	32	16<	-	4	IMP-1	N.D	-
PN16-52	<i>E. cloacae</i> complex	≤8	16<	-	4	IMP-1	N.D	-
PN16-53	<i>E. cloacae</i> complex	64	16<	-	4	IMP-1	N.D	-
PN16-55	<i>E. cloacae</i> complex	32	16<	-	2	IMP-1	N.D	-
PN16-59	<i>E. cloacae</i> complex	16	32<	8<	8<	IMP-1	N.D	-
PN16-60	<i>E. cloacae</i> complex	64<	32<	8	8<	IMP-1	N.D	-
PN16-61	<i>K. oxytoca</i>	8	32<	8	8<	IMP-1	N.D	-
PN16-73	<i>E. cloacae</i> complex	≤8	32<	8<	8<	IMP-1	N.D	-
PN15-17	<i>E. coli</i>	-	16	2<	2<	NDM	N.D	N.D
PN15-27	<i>E. cloacae</i> complex	≤16	32<	4	4<	IMP-1	N.D	N.D
PN15-47	<i>E. cloacae</i> complex	32	16<	-	8	IMP-1	TEM, CTX-M-9	N.D
PN15-49	<i>E. cloacae</i> complex	128<	16<	-	8	IMP-1	N.D	N.D
PN15-50	<i>E. cloacae</i> complex	16	16<	-	2	IMP-1	N.D	N.D
PN15-56	<i>E. cloacae</i> complex	128	16<	-	4	IMP-1	N.D	N.D
PN15-57	<i>K. oxytoca</i>	≤8	16<	-	≤1	IMP-1	N.D	N.D
PN15-58	<i>K. pneumoniae</i>	≤8	16<	-	8	IMP-1	N.D	N.D
PN15-60	<i>K. oxytoca</i>	64<	32<	2	2<	IMP-1	N.D	N.D
PN15-69	<i>K. pneumoniae</i>	64<	32<	2	2<	IMP-1	TEM SHV	N.D
PN15-75	<i>K. pneumoniae</i>	64<	32<	2	2<	IMP-1	TEM SHV	DHA
PN15-77	<i>K. pneumoniae</i>	64<	32<	2	2<	IMP-1	N.D	DHA
PN14-6	<i>K. pneumoniae</i>	≤16	32<	2	2<	IMP-1	TEM, SHV	N.D
PN14-8	<i>K. pneumoniae</i>	≤16	32<	2<	2<	IMP-1	N.D	N.D
PN14-12	<i>E. cloacae</i> complex	64	64≤	4	-	IMP-1	N.D	N.D
PN14-15	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	≤0.25	8	IMP-1	SHV, CTX-M-2	N.D
PN14-18	<i>E. coli</i>	≤16	32<	≤1	2	IMP-1	CTX-M-2	N.D
PN14-19	<i>E. coli</i>	≤16	32<	≤1	2<	IMP-1	CTX-M-2	N.D
PN14-22	<i>E. cloacae</i> complex	≤16	32<	2<	2<	IMP-1	N.D	N.D
PN14-23	<i>E. cloacae</i> complex	64<	32<	2<	2<	IMP-1	N.D	N.D
PN14-24	<i>K. pneumoniae</i>	≤16	32<	≤1	2<	IMP	CTX-M-2	N.D
PN14-25	<i>E. cloacae</i> complex	≤16	32<	2<	≤1	IMP-1	N.D	N.D
PN14-38	<i>E. cloacae</i> complex	64	16<	-	2	IMP-1	N.D	N.D
PN14-42	<i>K. pneumoniae</i>	16	16<	-	4	IMP-1	TEM, CTX-M-1	N.D
PN14-43	<i>K. pneumoniae</i>	16	16<	-	16	IMP-1	N.D	N.D

--: not tested, N.D: not detected

図 3

MLST 法による解析では、CPECC は 6 つの ST があり、ST78 が 12 株 (66.7%) と最も多く、一方 *K. pneumoniae* の CPE は 8 つの ST があり、ST37 が 5 株 (26.3%) で最も多かった。同一施設内では CPECC の水平伝播は見られたが、施設を超えての伝播はまれであったが、ST78 は関東でも検出され、愛知県でも複数施設で検出されており注意が必要と考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Kato D, Morioka H, Tomita Y, Iguchi M, Hirabayashi A, Tetsuka N, Sodomoto T, Hyoudo M, Mochizuki M, Osada Y, Yamamoto M, Kato Y, Inagaki T, Ichikawa K, Yagi T, Active surveillance in response to the identification of a single carbapenemase-producing *Escherichia coli* at a Japanese university hospital., *Journal of infection and chemotherapy*, 査読有, 24(12), 2018, 1013-1015, doi: 10.1016/j.jiac.
- 2) 八木哲也, カルバペネム耐性腸内細菌科細菌に対する感染対策、化学療法の領域、査読無、Vol.32 No.11, 2016, 10 (1130) -12 (1132)

[学会発表] (計 12 件)

- 1) 原 祐樹、井口光孝、八木哲也、耐性菌表現型検査としての Multiple Disk Synergy Test

- の性能評価、第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術集会、2019
- 2) 八木哲也 (日本環境感染症学会合同シンポジウム) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の感染対策、第 88 回日本感染症学会西日本地方会学術集会/ 第 61 回日本感染症学会中日本地方会学術集会/ 第 66 回日本化学療法学会西日本支部総会、2018
 - 3) 井口光孝、原 祐樹、手塚直行、森岡 悠、平林亜希、富田ゆうか、加藤大三、八木哲也、愛知県内のカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の動向調査 (第一報) 疫学、第 92 回日本感染症学会学術講演会/第 66 回日本化学療法学会総会/合同学会、2018
 - 4) 原 祐樹、井口光孝、手塚直行、森岡 悠、平林亜希、富田ゆうか、加藤大三、八木哲也、愛知県内のカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の動向調査 (第二報) 遺伝子解析、第 92 回日本感染症学会学術講演会/第 66 回日本化学療法学会総会/合同学会、2018
 - 5) 八木哲也 (シンポジウム 8) 海外における多剤耐性グラム陰性桿菌の現状、第 92 回日本感染症学会学術講演会/第 66 回日本化学療法学会総会 合同学会、2018
 - 6) 八木哲也 (パネルディスカッション 3) 我が国における CRE/CPE の感染対策はどうあるべきか、第 33 回日本環境感染症学会総会・学術集会、2018
 - 7) 八木哲也 (教育講演).カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 .第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 岐阜 2018
 - 8) 富田ゆうか、井口光孝、森岡悠、岡圭輔、長田ゆかり、大蔵照子、嶋岡菜美、三田直美、伊藤まゆみ、河村絢子、松本恭子、川村和光、八木哲也 . 当院における多剤耐性グラム陰性菌検出時の積極的保菌調査の現状と課題 . 第 29 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 岐阜 2018
 - 9) 八木哲也 (ベーシックレクチャー 2) CPE に対する感染対策、第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会/第 65 回日本化学療法学会総会 合同学会、2017
 - 10) 松本あかね、手塚直行、加藤拓樹、森岡悠、井口光孝、富田ゆうか、加藤大三、八木哲也、当院におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症届出例の検討、第 91 回日本感染症学会総会・学術講演会/第 65 回日本化学療法学会総会 合同学会、2017
 - 11) 八木哲也、Trend of antimicrobial resistance in Japan、第 28 回日本臨床微生物学会総会・学術集会、2017
 - 12) 手塚直行、井口光孝、加藤大三、豊留有香、兵道美由紀、長田ゆかり、八木哲也、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌への感染対策の実践とその効果、第 32 回日本環境感染症学会総会・学術集会、2017

〔図書〕(計 4 件)

- 1) 八木哲也、CRE (カルバペネム耐性腸内細菌科細菌) Modern Physician、(株)新興医学出版、Vol.38 No.3、229-232、2018.
- 2) 井口光孝、八木哲也、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 月間薬事 1 月臨時増刊号、じほう、Vol.60 No.2、157 (325) -165 (333) 2018.
- 3) 八木哲也、3.3 腸管内の耐性菌保菌スクリーニングと感染対策、MEDICAL TECHNOLOGY、医歯薬出版、Vol.45 No.10、1057-1061、2017
- 4) 八木哲也、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌について、Hos Com、病院感染対策のための情報誌、Vol.13 No.2、1-7、2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 (該当なし)

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：井口 光孝

ローマ字氏名：(IGUCHI, mitsutaka)

研究協力者氏名：富田 ゆうか

ローマ字氏名：(TOMITA, yuuka)

研究協力者氏名：加藤 大三

ローマ字氏名：(KATO, daizo)

研究協力者氏名：森岡 悠

ローマ字氏名：(MORIOKA, hiroschi)

研究協力者氏名：手塚 宜行

ローマ字氏名：(TETSUKA, nobuyuki)

研究協力者氏名：稲垣 孝行

ローマ字氏名：(INAGAKI, takayuki)

研究協力者氏名：平林 亜希

ローマ字氏名：(HIRABAYASHI, aki)

研究協力者氏名：鈴木 仁人

ローマ字氏名：(SUZUKI, hitoshi)

研究協力者氏名：柴山 恵吾

ローマ字氏名：(SHIBAYAMA, keigo)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。