

令和元年6月13日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09940

研究課題名(和文)カルバペネマーゼ産生大腸菌・肺炎桿菌感染症の新規治療法構築に向けた包括的研究

研究課題名(英文) Molecular epidemiology and characteristics of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：2014年～2017年にかけて本邦で分離されたカルバペネマーゼ産生大腸菌および肺炎桿菌をそれぞれ136株、104株を収集した。カルバペネマーゼ産生大腸菌はすべてがIMP型酵素を産生しており、このうち130株がIMP-6、5株がIMP-1を、1株がIMP-11を産生していた。99株がCTX-M-2グループを同時に産生していた。カルバペネマーゼ産生肺炎桿菌も全てがIMP型酵素を産生しており、83株がIMP-6を、21株がIMP-1を産生していた。また、73株がCTX-M型酵素を同時に産生していた。本邦におけるカルバペネマーゼ産生菌はIMP-6が優位であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の解析で、本邦におけるカルバペネマーゼはIMP-6産生菌が優位であった。IMP-6産生菌はカルバペネム系薬であるイミペネムのMIC値が低いことから、IMP型酵素産生菌と認識できない可能性が示唆され、医療関連感染対策の遅れや、不適切な治療に繋がる可能性が危惧される。また、多くがIncNに属したが、IncNプラスミドは大腸菌、肺炎桿菌を中心に広く腸内細菌科細菌を宿主とすることができ、さらに伝達頻度も非常に高いことから、今後、各種腸内細菌科細菌に伝播拡散していく可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Between 2014 and 2017, 136 carbapenemase-producing *E. coli* and 104 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* were obtained throughout Japan. All were positive for IMP, and 130 *E. coli* and 83 *K. pneumoniae* carried IMP-6 gene. Of these IMP-6 producers, 99 *E. coli* and 73 *K. pneumoniae* were positive for the CTX-M enzyme. In this study, we found the high frequency of IMP-6 among *E. coli* and *K. pneumoniae* in Japan.

研究分野：薬剤耐性菌

キーワード：薬剤耐性菌 カルバペネマーゼ 大腸菌 肺炎桿菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

$\beta$ -ラクタム系薬は、その殺菌性、安全性から、臨床の現場で最も頻繁に使用され、臨床医が最も使い慣れている有用な抗菌薬である。特にカルバペネム系薬は、重症感染症や易感染性患者に対して使用されることの多い有用な薬剤であるが、カルバペネマーゼはこれら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、臨床上、大きな問題となる酵素といえる。さらに、本酵素産生菌は多剤耐性化傾向にあり、抗菌薬療法において選択できる薬剤が全くないということも経験され、臨床現場において深刻な問題となっている。また、耐性遺伝子はプラスミドに位置するものがほとんどであり、プラスミドが菌種を越えて伝達していくことから、一度検出されると早急に伝播拡散する危険性が指摘され、医療関連感染対策上も問題となる酵素である。

2013年3月、米国CDCによりカルバペネム系薬に耐性を示す腸内細菌科細菌 (Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: CRE) による感染症が増加しており、早急な対応の必要性が報告された。これに伴い、厚労省より各自治体に腸内細菌科のカルバペネム耐性菌についての事務連絡がなされ、本邦でもCREの存在が注目され始めた。さらに、2014年4月、WHOによりCREを含めた薬剤耐性菌が世界的な脅威となっていることが警告されている。現在、CREによる敗血症は死亡率が50%を越え、CREの脅威が世界的に認識されている。

このカルバペネマーゼであるが、海外ではVIM型が優位であったが、1996年にKPC型酵素産生肺炎桿菌が (Antimicrob Agents Chemother 45:1151-61, 2001)、2009年にNDM型酵素産生肺炎桿菌が (Lancet Infect Dis 10: 597-602, 2010) 新規に分離され、その後、各種腸内細菌科から、これらの検出頻度が急激に上昇し、上記の米国CDCからの警告につながった。一方、本邦では、IMP型が優位であり、現在48の亜型が報告されているが (2014年10月2日現在)、これまで本邦では、IMP型の中でもIMP-1産生菌がほとんどを占めていた。ところが近年、肺炎桿菌、大腸菌を中心にIMP-6産生菌の増加が報告されて始めた (Antimicrob Agents Chemother 56: 4554-4555, 2012)。

このIMP-6は、2001年に研究代表者である矢野が *Serratia marcescens* から世界で初めて発見し報告した酵素である (Antimicrob Agents Chemother 45:1343-8, 2001)。IMP-6は、IMP-1の構造遺伝子で640番目のアデニンがグアニンに変異しており、196番目のアミノ酸がセリンからグリシンに置換したものである。このアミノ酸置換により、カルバペネム系薬に対する基質特異性が変化しており、IMP-1はメロペネムよりイミペネムをより効率よく分解する酵素であるが、IMP-6はイミペネムの分解を苦手にしており、メロペネムをより分解することのできる酵素である。

これまで海外も含めIMP-6の大きな拡散の報告はみられなかったが、2012年、本邦で肺炎桿菌からIMP-6産生菌が5株分離されたことをShigemotoらが報告している (Diagn Microbiol Infect Dis 72: 109-12, 2012)。また、我々も2012年に本邦全域から収集した大腸菌のなかでSMA test 陽性54株について解析したところ、IMP-6が49株、IMP-1が5株と、IMP-6産生大腸菌がIMP-1産生大腸菌とかわって本邦で優位な型になっていることを報告した (Antimicrob Agents Chemother 56: 4554-5, 2012)。さらに、このIMP-6産生プラスミドはCTX-M-2産生遺伝子も同時に保有しており、すなわちIMP-6産生菌はモノバクタム系薬を含む全ての $\beta$ -ラクタム系薬が無効となることを報告した。また、PFGEを施行したところ、40種類以上のPFGEパターンがみられ、本邦において特定のクローンが流行しているのではなく、プラスミドの接合伝達による拡散の可能性が高いことを明らかとした (図1)。

最近、IMP-6産生大腸菌、肺炎桿菌が、近畿地方のある総合病院でアウトブレイクを起こし、マスコミにより大きく報道されたことは記憶に新しい。本菌がアウトブレイクを起こした理由のひとつに、IMP-6産生菌は、薬剤感受性試験でカルバペネム系薬、特にイミペネムに対する最小発育阻止濃度 (MIC) が低いため、カルバペネマーゼ産生菌と認識されにくいことから (ステルス型耐性とも呼ばれている)、適切な医療関連感染対策が取られないことがあげられる。我々の報告においても、IMP-6産生大腸菌49株の薬剤感受性試験では、イミペネムが100%感性、メロペネムにおいても70%以上が感性 (CLSIのカテゴリー) を示し、薬剤感受性試験結果のみでは、本酵素産生菌がカルバペネマーゼ産生菌と認識することは困難である (Antimicrob Agents Chemother 56: 4554-5, 2012)。

一方で、MICが低いことは治療において有利とはならない。本菌を通常の菌量 ( $5 \times 10^4$  cfu) でMICを測定すると感性 (S) に分類されるが、我々の基礎実験では、菌量を100倍にしてMICを測定すると、本菌は酵素産生菌であるため4~5管 (16~32倍) MICが上昇することを確認している。したがって、菌量の多い膿瘍や菌血症においては、治療にカルバペネム系薬を使用すると治療失敗、あるいは除菌失敗に結びつく可能性が考えられる。実際、同じカルバペネマーゼであるKPC産生菌では、KPCと認識できないでカルバペネム系薬を使用したところ、50%以上の症例が治療失敗であったとの報告がある (Diagn Microbiol Infect Dis 64: 233-5, 2009)。すなわち、IMP-6産生菌においても、医療従事者が本菌であることを認識して治療および感染対策を実施して行く必要があり、病院検査室レベルで可能な検出法の開発が急務となっている。

## 2. 研究の目的

カルバペネム系薬は、重症感染症や易感染性患者において使用される重要な薬剤であることから、カルバペネム系薬を分解するカルバペネマーゼは、臨床上、大きな脅威となる。本邦では、IMP-6 産生大腸菌や肺炎桿菌が主に分離されている。この IMP-6 産生菌は、イミペネムに対し感性 (S) を示すことから、カルバペネマーゼ産生菌と認識することが困難であるため、カルバペネム系薬使用による治療失敗例や、適切な感染管理が行われずアウトブレイクする例がみられ、マスコミにも大きく報道されている。そこで本研究では、本邦全域からカルバペネマーゼ産生大腸菌および肺炎桿菌を収集し、その分子疫学的解析を行うとともに、病院検査室レベルで可能な新規検出法を開発し、実地臨床、伝播拡散制御に寄与する情報を発信することを目的とする。

## 3. 研究の方法

平成 27 年度は、①奈良医大、東北大、帝京大、BML (株) にて分離されたセファロsporin 耐性でスクリーニングした大腸菌、肺炎桿菌を収集し、②薬剤感受性試験、③SMA test, modified Hodge test, UV 法によるカルバペネマーゼ産生の確認、④PCR 法によるカルバペネム耐性遺伝子の検索、および塩基配列決定による詳細な型別を行う。

平成 28 年度、29 年度では、27 年度に実施したことを継続し、さらに⑤PFGE および MLST による分子疫学解析、⑥不和合性群決定によるプラスミドの型別と全塩基配列決定による包括的解析を行う。

## 4. 研究成果

2014 年から 2017 年にかけて本邦全域から分離された大腸菌、肺炎桿菌のうち、カルバペネマーゼを産生する大腸菌 136 株と肺炎桿菌 104 株を対象とした。対象株について、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準じた寒天平板法による薬剤感受性試験、Carbapenem Inactivation Method (CIM)、PCR 法およびシークエンスによるカルバペネマーゼの型別、J53 株を recipient とする接合伝達試験、プラスミドの Incompatibility (不和合性群, Inc) の決定を行った。

大腸菌 136 株の全てが CIM 陽性で、薬剤感受性試験による MIC 値からは、メロペネム、イミペネム、レボフロキサシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリンにそれぞれ 5.8% (8/136), 0% (0/136), 95% (130/136), 33% (45/136), 88% (120/136) が耐性を示した。また、全ての株が IMP 型酵素を産生しており、このうち 130 株 (95.6%) が *bla*<sub>IMP-6</sub> を、5 株 (3.7%) が *bla*<sub>IMP-1</sub> を、1 株 (0.7%) が *bla*<sub>IMP-11</sub> を保有していた。99 株が ESBL である CTX-M-2 グループが陽性であった。IMP-6 遺伝子保有プラスミドは全て IncN に属し、伝達頻度は  $4.5 \times 10^{-4}$  から  $1.1 \times 10^{-3}$  であった。

肺炎桿菌 104 株のうち全てが IMP 型酵素を産生しており、83 株が IMP-6 を、21 株が IMP-1 を産生していた。また、73 株が CTX-M 型酵素を同時に産生していた。IMP-6 産生株については、CTX-M-15, M-35, M-65 といった多様性も認められた。いずれの株もカルバペネマーゼの産生が確認されたが、多くの株のカルバペネムの MIC は低い傾向にあった。接合伝達の結果、IMP-1 は伝達されなかったが、IMP-6 保有株は全て伝達可能であり、特に IMP-6, CTX-M-2 を同時に保有する株の伝達頻度は  $10^{-2}$  と非常に高かった。

今回の解析で、本邦におけるカルバペネマーゼは IMP-6 産生菌が多くを占め優位であった。しかし、カルバペネム系薬であるイミペネムの MIC 値が低いことから、IMP 型酵素産生菌と認識できない可能性が示唆され、医療関連感染対策の遅れや、不適切な治療に繋がる可能性が危惧される。また、多くが IncN に属したが、IncN プラスミドは大腸菌、肺炎桿菌を中心に広く腸内細菌科細菌を宿主とすることができ、さらに伝達頻度も非常に高いことから、今後、各種腸内細菌科細菌に伝播拡散していく可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

〔学会発表〕(計 121 件)

〔図書〕(計 4 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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：笠原 敬  
ローマ字氏名：Kei Kasahara  
所属研究機関名：奈良県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：50405403

研究分担者氏名：中野竜一  
ローマ字氏名：Ryuichi Nakano  
所属研究機関名：奈良県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：80433712

研究分担者氏名：遠藤史郎  
ローマ字氏名：Shiro Endo  
所属研究機関名：東北大学  
部局名：大学病院  
職名：非常勤講師  
研究者番号（8桁）：40614491

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。