

令和元年6月15日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11047

研究課題名(和文) 尿路感染症における多剤耐性菌の迅速診断・迅速疫学診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of rapid detection and epidemiological method of Multi-drug resistant bacteria in urinary tract infection

研究代表者

重村 克巳 (Shigemura, Katsumi)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：00457102

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)：尿路感染症の迅速診断を目的とした質量分析の原理を利用したMALDI-TOF-MS法を用い、以前より診断に難渋していたグラム陽性菌について処理法を改良して、論文発表を行った。大腸菌に対する疫学迅速診断のMultiple-Locus Variable Number Tandem-Repeat Analysis: MLVA法の基礎実験を行い、本菌株での識別が可能であることを示した。カルバペネム耐性大腸菌23株とESBL産生大腸菌67株をMLVAにてシーケンスにて確定したリピート数の異なる大腸菌株をそれぞれの領域毎に抽出し、リピート数の判定をし、樹形図を作成し、非常に近縁な株であると判定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の薬剤耐性細菌の増加に伴い、かつ国家レベルでの抗菌薬使用制限、適正使用指導の徹底が求められている。本MALDI-TOF MSの研究では上記の2方法にて尿路感染症の原因菌の迅速診断法の確立し、従来の尿培養検査よりは数日以上早く適切な治療を開始できることを提言できた。またMLVA法においては、特に疫学調査としての菌の伝播形式を迅速に視覚的に診断できる方法を尿路感染症の主要な原因菌である、それも薬剤耐性の大腸菌を用いて確立した。これにより特に院内感染の早期診断に役立ち、一刻も早い解決策の立案に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We studied MALDI-TOF-MS using the principle of Mass spectrometry for the purpose of rapid diagnosis of urinary tract infections, and demonstrated improved method for gram-positive bacteria where we had troubles for their detection, and presented the paper. Next, we performed the basic experiment Multiple-Locus Variable Number Tandem-Repeat Analysis: MLVA for rapid epidemiological diagnosis of Escherichia coli and showed the efficacy on that purpose. That is, using the carbapenem-resistant E. coli (n=23) and extended-spectrum beta-lactamase ESBL producing E. coli (n=67) and we extracted those bacteria with different repeat number in every region and decided repeat number. Then, it was diagnosed as closely related bacteria from tree diagram.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路感染症 薬剤耐性菌

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

### 1. 研究開始当初の背景

高度耐性 -ラクタマーゼ産生菌から薬剤耐性遺伝子が菌種を超えて病原性の高い細菌に伝播し、蔓延した場合、重症・難治例が増加することが懸念される。この診断については、現状判定に日数がかかる。さらに伝播形式把握のための疫学検査も手技間誤差があり、かつ迅速性に欠けるため、院内感染抑制効果に直接結びつくものではない。そのため -ラクタマーゼ産生菌の迅速・疫学診断が求められている。

### 2. 研究の目的

尿路感染症領域にて高い臨床効果を有してきたカルバペネム系など -ラクタム系抗菌薬に耐性を示す腸内細菌の出現・蔓延には注意を要する。その主な耐性機構は同系抗菌薬を分解する酵素、すなわち -ラクタマーゼを菌が産生することである。これらを原因菌とする感染症は治療抵抗性で、患者の救命のみならず、院内感染の観点からも蔓延を抑えることは喫緊の課題であり、早急な診断法や疫学調査の確立は急務である。これまでの診断・疫学診断であるホッジ(変法)テストやパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)などは迅速性に欠けるなど臨床的には問題点が多い。本研究は質量分析法の原理を用いた Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry: MALDI-TOF-MS 法による迅速診断法の臨床現場での実用化と、新たな分子タイピング法である Multiple-Locus Variable Number Tandem-Repeat Analysis: MLVA による迅速疫学診断を臨床活用しオンタイムに院内感染対策に結びつけることにより、感染症への適正抗菌化学療法と院内感染抑制との重要命題を同時に解決するものである。

### 3. 研究の方法

本研究課題 カルバペネム耐性など -ラクタム系抗菌薬高度耐性菌の分子遺伝学的ならびに分子疫学的解析を行い、迅速診断・迅速疫学診断法の確立を研究目的とする。目的達成のために以下の研究目標を期間内に達成する。

(1) 神戸大学医学部附属病院及び関連施設にて尿路感染症より分離同定されたグラム陰性菌に対して、薬剤感受性試験を行う。さらに -ラクタマーゼ阻害剤配合高用量ペニシリン、第3世代セフェム系、カルバペネム耐性菌の確認(ESBL産生試験、ホッジ(変法)テストなどの簡易スクリーニング試験とPCRによる -ラクタマーゼ関連遺伝子確認試験)を行い、型別を判定する。

(2) -ラクタム系高度耐性菌について、LAMP法、multiplex PCR、MALDI-TOF MS、real-time PCR などにより菌種の同定および遺伝子型別の迅速診断を行う。

(3) これら菌株について迅速疫学検査として Multilocus sequence typing (MLST) 解析、さらに迅速法として、MLVA、rep-PCR により迅速に類似性と相違性を確認し、耐性菌の伝播様式を診断する。

### 4. 研究成果

#### ESBL産生大腸菌について

尿路感染症の主な原因菌である大腸菌 72 株は ESBL と確認された。血清型の解析では O 血清型では O25 がもっとも多く、40.3% (34/72) に認められ、そのうち世界中で広まっている ESBL クローンとして有名である O25:H4 は 29 株であった。*bla<sub>CTX</sub>* 陽性となった株についてシーケンス解析を行ったところ、CTX-M-14 が最も多く 45.8% (33/72) に認め、次に CTX-M-27 が 19.4% (14/72) であった。世界で ESBL の代表的なクローンとして知られている CTX-M-15 は 12.5% (9/72) に認めた。29 株の O25:H4 型 においては CTX-M-14、CTX-M-15、CTX-M-27 が MLST における Sequence type (ST) 131 に分類された。rep-PCR での解析では全株が 18 グループに分けられ、O25 血清型、CTX-M-15、ST131 は同一グループに分類された。このように日本においても世界で蔓延している CTX-M-15 の ESBL 産生大腸菌 O25:H4 型の ST131 タイプが増えてきていることが確認され、さらにはもっとも多く検出された CTX-M-14 を含む CTX-M-9 グループでは病原遺伝子との関連が深いことがわかった。

#### カルバペネム耐性菌について

尿路感染症原因菌として関連施設などよりカルバペネム耐性の大腸菌は 23 株を用いて、型別診断を行い、IMP-6 型および CTX-M-2 型産生大腸菌ならびに IMP-6 型および CTX-M-15 型の大腸菌が検出された。また菌の伝播様式を調査するため、疫学検査としての MLST 解析によりこれらの株は ST131 であった。また、カルバペネム耐性緑膿菌 64 株では、カルバペネム耐性に関連のある MBL 陽性株において、その関連遺伝子につき分類を行うと、IMP-7 型がその約半数を占め、次いで IMP-1 型、IMP-34 型、VIM-1 型という分布となった。また MLST 解析の結果、これら菌株は clonal complex (CC) 235 または CC357 に分類された。また、カルバペネマーゼ産生性に関しては、主に分離される IMP-1 型の ST235 株の他、日本で初めて IMP-7 型の ST357 株が確認された。また、カルバペネマーゼ非産生株では、産生株において世界中で報告されている ST235 株、ST357 株、ST622 株が見られ、薬剤排出ポンプを構成する遺伝子 *mexA*、*mexB* の過剰発現や、これらを制御する遺伝子 *mexR*、*nalC*、*nalD* の変異が認められた。これらがカルバペネム耐性の根拠になっている可能性が考えられた。

さらに薬剤透過孔を構成する遺伝子 *oprD* の発現量低下および変異も認められ、発現量低下が見られた株に特異的な変異のうち、del nt 1190-1217 は新規の変異であった。腸内細菌科細菌では、カルバペネム耐性肺炎桿菌 18 株についてカルバペネマーゼ産生株は 14 株 (77.8%) で、MLST の結果、ST37 が 11 株と最も多く存在していた。また薬剤透過孔に関する遺伝子の変異をみたところ、*OmpK35* は変異が認められなかったものの、*OmpK36* に変異が見られた株が 18 株中 8 株 (44.4%) であった。さらには薬剤排出ポンプ関連遺伝子である *AcrB* や *OqxB* を比較したところ、すべての株において高い発現が認められた。

#### 新たな検出方法の確立

尿路感染症の迅速診断を目的とした質量分析の原理を利用した MALDI-TOF-MS 法を用い、以前よりその細胞壁の構造の違いから難渋していたグラム陽性菌については処理法を改良して、第 32 回ヨーロッパ泌尿器科学会で発表し、論文発表した。大腸菌に対する疫学迅速診断の MLVA 法の基礎実験を行い、本菌株での識別が可能であることを示した。カルバペネム耐性大腸菌 23 株と ESBL 産生大腸菌 67 株を MLVA にてシーケンスにて確定したリピート数の異なる大腸菌株をそれぞれの領域毎に抽出し、リピート数の判定をし、MLST による樹形図を作成した。その系統解析したところ、非常に近縁な株であると判定した。

## 5 . 主な発表論文など

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Osawa K, Shigemura K, Kitagawa K, Fukuda T, Takasaka A, Wakabayashi S, Sato K, Yamamichi F, Shirakawa T, Fujisawa M. Molecular characteristics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine in Hyogo, Japan. *Int J Urol*. 2019;26(1):127-133.

Kuntaman K, Shigemura K, Osawa K, Kitagawa K, Sato K, Yamada N, Nishimoto K, Yamamichi F, Rahardjo D, Hadi U, Mertaniasih NM, Kinoshita S, Fujisawa M, Shirakawa T. Occurrence and characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: A collaborative study of antibiotic-resistant bacteria between Indonesia and Japan. *Int J Urol*. 2018;25(11):966-972.

Nakanishi N, Nomoto R, Sato K, Koike C, Kusuki M, Nakamura T, Shigemura K, Shirakawa T, Fujisawa M, Tokimatsu I, Osawa K. Acquisition of antimicrobial-resistant variants in repeated infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* revealed by whole genome sequencing. *J Infect Chemother*. 2019;25(2):154-156.

Bagus Wasito E, Shigemura K, Osawa K, Fardah A, Kanaida A, Raharjo D, Kuntaman K, Hadi U, Harijono S, Marto Sudarmo S, Nakamura T, Shibayama K, Fujisawa M, Shirakawa T. Antibiotic Susceptibilities and Genetic Characteristics of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Stools of Pediatric Diarrhea Patients in Surabaya, Indonesia. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2017;70 : 378 - 382

Kitagawa K, Shigemura K, Onuma KI, Nishida M, Fujiwara M, Kobayashi S, Yamasaki M, Nakamura T, Yamamichi F, Shirakawa T, Tokimatsu I, Fujisawa M. Improved bacterial identification directly from urine samples with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Lab Anal*. 2018;32(3)

Shigemura K, Kitagawa K, Osawa K, Yamamichi F, Tokimatsu I, Nomi M, Takaba K, Fujisawa M. Comparison of antibiotics use, urinary tract infection (UTI)-causative bacteria and their antibiotic susceptibilities among 4 hospitals with different backgrounds and regions in Japan. *J Chemother*. 2018;30(1):31-36.

Ikeda Y, Shigemura K, Nomi M, Tabata C, Kitagawa K, Arakawa S, Fujisawa M. Infection control following an outbreak of extended-spectrum broad-spectrum lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from catheter-associated urinary tract infection. *Jpn J Infect Dis*. 2018;71(2):158-161.

〔学会発表〕(計 7 件)

[学会発表]

重村克巳、大澤佳代、高坂綾香、中野雄造、中村竜也、荒川創一、時松一成、藤澤正人  
兵庫県にて分離されたメタロ ラクタマーゼ産生緑膿菌の解析 第51回 緑膿菌感染症  
研究会 2017年2月

Katsumi Shigemura, Koichi Kitagawa, Fukashi Yamamichi, Yuzo Nakano, Issei  
Tokimatsu, Masato Fujisawa How to improve Gram-positive bacterial identification  
in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry  
(MALDI-TOF MS) for complicated urinary tract infection-causative bacteria?  
32th European Association of Urology Annual meeting 2017年3月

佐藤加奈子、大澤佳代、重村克巳、中村竜也 藤澤正人、時松一成、白川利朗  
兵庫県内で分離された *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤耐性機構の解析  
第12回日本臨床検査学教育学会学術大会 2017年8月

Noriko Nakanishi, Ryohei Nomoto, Kanako Sato, Chihiro Koike, Mari Kusuki, Tatsuya  
Nakamura, Katsumi Shigemura, Toshiro Shirakawa, Issei Tokimatsu, Kayo Osawa  
Analysis of antimicrobial resistance mechanism in successive infections of  
*Pseudomonas aeruginosa* 第91回日本細菌学会総会 2018年3月

佐藤 加奈子、大澤 佳代、重村 克巳、楠木 まり、中村 竜也、時松 一成、藤澤 正人  
カルバペネム耐性緑膿菌の薬剤耐性機構の解析 第66回日本化学療法学会学術集会  
2018年6月

重村克巳、藤澤正人 シンポジウム10：尿路性器感染症における遺伝子解析「カルバペ  
ネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)の耐性遺伝子解析ならびにその国際比較」について  
第107回日本泌尿器科学会総会 2019年4月

重村克巳、大澤佳代、江夏徳寿、北川孝一、白川利朗、中野雄造、藤澤正人 尿路感染  
症におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分子生物学的検討ならびに迅速診断法の確  
立 第28回泌尿器分子細胞研究会 2019年2月

〔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：  
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：大澤佳代

ローマ字氏名：Kayo Osawa

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院保健学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：50324942

研究分担者氏名：白川利朗

ローマ字氏名：Toshiro Shirakawa

所属研究機関名：神戸大学

部局名：大学院イノベーション研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：70335446

研究分担者氏名：荒川創一

ローマ字氏名：Soichi Arakawa

所属研究機関名：三田市民病院

部局名：泌尿器科

職名：病院長

研究者番号（8桁）：70159490

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：北川孝一

ローマ字氏名：Koichi Kitagawa

研究協力者氏名：山道深

ローマ字氏名：Fukashi Yamamichi

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。