

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19208

研究課題名(和文) アシネトバクター属菌のカルバペネム耐性化機構の解明と検査法開発

研究課題名(英文) Molecular characterization and acquisition of carbapenem resistance in Acinetobacter species

研究代表者

松井 真理 (Matsui, Mari)

国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官

研究者番号：50555761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アシネトバクター属菌は、世界中で急速に薬剤耐性化が進みその拡散が問題とされているが、日本国内ではその耐性化はあまり進んでいない。本研究ではその背景と耐性化機構を明らかにするため、国内臨床分離株の分子疫学解析とカルバペネマーゼ遺伝子型別を行った。世界流行株であるアシネトバクターバウマニ IC II系統株が国内でも広く分布していたが、海外分離株とは異なりそのほとんどは獲得型カルバペネマーゼ遺伝子を有していなかったこと、MLST解析では国内型STが多く存在したことが、国内での耐性化が進んでいない要因と考えられた。さらに、獲得型カルバペネマーゼ遺伝子保有プラスミドの配列比較を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内の臨床分離アシネトバクター属菌の分子疫学を明らかにすることができた。日本では多剤耐性アシネトバクターの分離報告は限られているものの、これまでにはいくつかの院内感染事例も報告されている。諸外国では2000年頃からアシネトバクター属菌の急速な薬剤耐性化が進んでおり、今後、日本国内で分離されるアシネトバクター属菌との比較解析に資する国内分離株の基礎データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Multidrug-resistant (MDR) Acinetobacter spp. have been globally disseminated in associated with the successful clonal lineage Acinetobacter baumannii international clone II (IC II). However, the prevalence of MDR Acinetobacter species isolates remains low in Japan. We performed the molecular characterization of clinical Acinetobacter species isolates collected nationwide in Japan. This study revealed carbapenem-susceptible A. baumannii IC II was moderately disseminated in Japan. The low prevalence of acquired carbapenemase genes and the presumptive domestic Sequence Types (STs) of Acinetobacter baumannii IC II could contribute to the maintenance of low rates of antimicrobial resistance among Acinetobacter spp. Furthermore, we performed whole genome sequencing of the isolates with acquired carbapenemase genes and comparative analysis of the plasmid sequences carrying the carbapenemase genes (blaOXA-23 or blaNDM, blaIMP) are in progress.

研究分野：細菌学、臨床微生物学

キーワード：アシネトバクター属菌 カルバペネム耐性 薬剤耐性菌 カルバペネマーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アシネトバクター属菌は、ブドウ糖非発酵のグラム陰性桿菌で、日和見感染症の原因菌として人工呼吸器関連肺炎、敗血症、創傷感染症などを引き起こす。2000年頃より世界各国でアシネトバクター属菌の多剤耐性化が進んでおり、蔓延が懸念される薬剤耐性菌のひとつである。アシネトバクター属菌は30以上の菌種が属するが、感染症の原因菌としては *Acinetobacter baumannii* の報告が最も多い。さらに、*A. baumannii* の特定の遺伝系統株は、多くの抗菌薬に耐性傾向を示し、かつ、アウトブレイク起因菌として世界中で報告されていることから、世界流行株 (International clone) と呼ばれている。アシネトバクター属菌の世界的な薬剤耐性化の背景には、これら世界流行株の蔓延があると考えられており、中でも *A. baumannii* International clone II (IC II) は、世界中に最も広く分布する多剤耐性クローンである。日本でも多剤耐性の *A. baumannii* IC II による院内感染事例が報告されているが、そのうちいくつかは海外からの持ち込みが発端であったと考えられている。一方で、日本では多剤耐性アシネトバクター属菌の分離報告は少なく、厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) 検査部門 2015 年公開情報では、多剤耐性株の割合はアシネトバクター属菌のわずか 0.5% であり、カルバペネム系抗菌薬であるイミペネム及びメロペネム耐性の割合も、それぞれ 3.2%、1.8% であった。2015 年時点で、中国 (CHINET)¹⁾、韓国 (KARMS)²⁾、ギリシャ、イタリア (ECDC)³⁾ など、アシネトバクター属菌のカルバペネム耐性率が 50% を超える国は世界中に散見されるが、日本での耐性率は極めて低く保たれている。

<参考文献>

1. Hu F, et al., 2018, Clin Infect Dis, 67
2. Kim YA and Park YS. 2018, Korean J Intern Med, 33:247-255
3. ECDC, Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015

2. 研究の目的

(1) アシネトバクター属菌の分子疫学解析は、これまで薬剤耐性株を対象とした報告が中心であった。本研究課題では、薬剤耐性株のみならず感性株も含めた菌株解析を実施することで、耐性株の少ない日本で分離されるアシネトバクター属菌の分子疫学を明らかにし、国内の耐性率が低く抑えられている要因を分析することを目的とする。

(2) アシネトバクター属菌の主なカルバペネム耐性機構は、OXA-23 型、OXA-58 型、OXA-40 型、IMP 型、NDM 型などのカルバペネマーゼ遺伝子を獲得し、産生することによる。それに加えて、アシネトバクター属のうち *A. baumannii* は、染色体上に OXA-51 型カルバペネマーゼ遺伝子を元来有しており、外来性のカルバペネマーゼ遺伝子獲得によらない耐性機構も有する。本研究では、アシネトバクター属のカルバペネム耐性化のメカニズムを明らかにする目的で、カルバペネマーゼ遺伝子保有株の配列解析を行う。

3. 研究の方法

(1) アシネトバクター属菌の分子疫学解析

国内 42 都道府県に位置する国立病院機構 86 医療機関で、2012 年～2013 年に分離されたアシネトバクター属菌 866 株を対象に以下の解析を実施した。

菌種同定と IC II の判定：既報に従い、菌種の同定は *rpoB* シークエンス、IC II の判定はパイロシークエンスによる *bla*_{OXA-51-like} の一塩基多型解析により判定した

薬剤感受性試験：ドライプレートを使用した微量液体希釈法にて 13 抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

カルバペネム耐性遺伝子の検出：PCR 法で、IMP 型、TMB 型、VIM 型、OXA-51 型、OXA-23 型、OXA-23 型、OXA-58 型、及び OXA 型上流の IS*Aba1* 配列検出を行った。

MLST 解析と β -ラクタマーゼ遺伝子の検出：解析対象株のうち、110 株の全ゲノムシークエンスを行い、MLST 解析と、薬剤耐性遺伝子データベースを参照した β -ラクタマーゼ遺伝子の検出を行った。

(2) アシネトバクター属菌のカルバペネム耐性化機構の解析

これまでの研究で得られた *A. baumannii* 株を対象に、染色体上に保有する OXA-51 型カルバペネマーゼ遺伝子 (*bla*_{OXA-51-like}) 配列を決定し、その遺伝子型とカルバペネム系抗菌薬であるメロペネム最小発育阻止濃度 (MIC) を比較解析した。

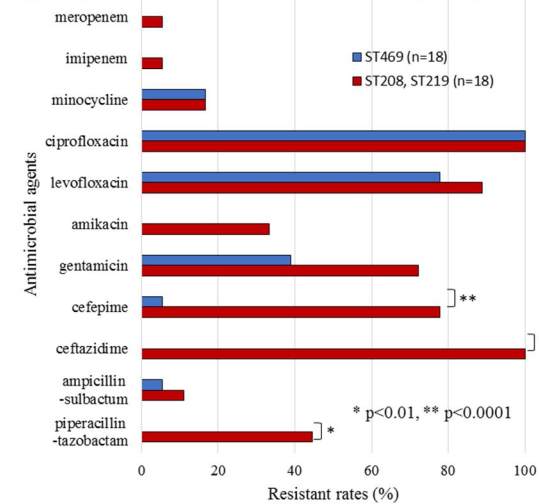
獲得型カルバペネマーゼ遺伝子 (OXA-23 型、OXA-58 型、IMP 型) を有するカルバペネム耐性アシネトバクター属菌 (*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter ursingii*) 計 43 株を対象に、全ゲノム解読を実施し、カルバペネマーゼ遺伝子の局在 (染色体もしくはプラスミド) の検討及びカルバペネマーゼ遺伝子配列の周辺構造比較を行った。全ゲノム解読は、S1-PFGE にて染色体 DNA とプラスミド DNA を分離後に実施した。カルバペネマーゼ遺伝子が検出されたプラスミドについては、得られた解読配列を用いて既報に従い、*in silico* でレプリコンタイピングを実施した。また、一部のプラスミドは、既報のアシネトバクター属菌のプラスミド配列等と比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) アシネトバクテリウム属菌の分子疫学解析

解析対象の 866 株のうち、*A. baumannii* が最も多く (n=645, 75%)、*Acinetobacter nosocomialis* (n=83, 10%)、*Acinetobacter pittii* (n=60, 7%) と続いた。日本は諸外国に比べアシネトバクテリウム属の薬剤耐性が低いことから、*A. baumannii* IC II は少ないと予想していたのに反し、*A. baumannii* IC II は全解析対象株の 28% を占めた。また、諸外国で報告されるアシネトバクテリウム IC II の多くが獲得型カルバペネマーゼ遺伝子を有するのに対して、本研究で解析した IC II のうち獲得型カルバペネマーゼ遺伝子を有した株は 9 株 (4%) のみであった。さらに、MLST 解析により、本研究解析対象の IC II (n=37) は、諸外国で報告される Sequence Type (ST) (ST208, n=14; ST219, n=4) と、国内型である ST469 (n=18) に大別され、国内型の ST469 は多くの抗菌薬に感性であった。一方で、ST208 と ST219 は、ST469 に比べて多くの抗菌薬に耐性傾向を示し (Fig)、セファロsporin 系抗菌薬耐性は染色体性 AmpC-ラクタマーゼ過剰産生が寄与することが示唆された。以上より、カルバペネム感性の *A. baumannii* IC II が既に国内に広く分布していることが明らかとなった。しかしながら、海外分離株とは異なり獲得型カルバペネマーゼ遺伝子保有株が少ないこと、国内型 ST の存在が、日本でアシネトバクテリウム属の薬剤耐性が諸外国に比べて進んでいない要因であることが示唆された。

Fig. Comparison of rates of antimicrobial resistance among ST208, ST219 and ST469



(2) アシネトバクテリウム属菌のカルバペネム耐性化機構の解析

A. baumannii は、染色体上にカルバペネマーゼ遺伝子である $bla_{OXA-51-like}$ を有する。プロモーター配列を内部に有する IS $Aba1$ などの挿入配列が $bla_{OXA-51-like}$ 上流に挿入されることで、その発現量が上昇し、カルバペネム系抗菌薬に耐性化するといわれている。しかしながら、海外のカルバペネム耐性株の多くが $bla_{OXA-51-like}$ 以外の獲得型カルバペネマーゼを有することから、 $bla_{OXA-51-like}$ の耐性化への寄与を調べた報告は少ない。本研究では、他の獲得型カルバペネマーゼ遺伝子を持たない IS $Aba1$ - $bla_{OXA-51-like}$ 保有 *A. baumannii* 60 株を対象に、 $bla_{OXA-51-like}$ 配列とメロペネム MIC 分布を比較解析した。対象株のメロペネム MIC 分布は、0.5 μ g/mL ~ 32 μ g/mL と広域にわたっていた。そのうち、CLSI M100-30th の判定基準で感性と判定される MIC 2 μ g/mL の 47 株すべてにおいて、 $bla_{OXA-51-like}$ 配列は bla_{OXA-66} であったのに対し、MIC 4 μ g/mL 以上の 13 株のうち bla_{OXA-66} は 2 株 (15%) のみであった。その他の株の $bla_{OXA-51-like}$ 配列は、 bla_{OXA-80} (n=4)、 bla_{OXA-82} (n=4)、 bla_{OXA-83} (n=1)、 $bla_{OXA-104}$ (n=1)、 $bla_{OXA-254}$ (n=1) であった。以上の結果より、産生される OXA-51 型カルバペネマーゼ配列とメロペネム MIC には相関があると考えられた。メロペネム非感性株の OXA-51 型カルバペネマーゼのうち、OXA-104 を除く 4 種の配列は、OXA-66 に比べて 1 アミノ酸置換を生じる 1 塩基置換のみを認めた。このことから、染色体上に存在する OXA-51 型カルバペネマーゼ遺伝子の変異によって、カルバペネム耐性化しうることを示唆された。

IMP 型カルバペネマーゼ遺伝子は、解析対象 29 株すべてにおいてプラスミド上に存在することが示唆され、その推定プラスミドサイズは約 90 kb ~ 350 kb であった。一方、OXA-23 型カルバペネマーゼ遺伝子保有 12 株のうち、10 株では bla_{OXA-23} が、染色体上に存在することが示唆された。 bla_{OXA-23} がプラスミド上に存在する 2 株を比較したところ、MLST では同一の ST2 に属する株であるが、 bla_{OXA-23} の周辺構造は一方が Tn2008、他方は Tn2009 であり、それらを担うプラスミドも異なるものであったことから、異なるタイプのクローンであると推察された。また、NDM 型メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子 (bla_{NDM}) 保有 *Acinetobacter variabilis* の全ゲノム解読を実施し、 bla_{NDM-1} は 43,478 bp のプラスミドに存在することを見出した。相同性の高い bla_{NDM-1} プラスミド配列は、GenBank データベースに複数の国から登録されており、挿入配列 (IS) 領域を除くと互いに極めて高い相同性を示した。このプラスミドは、*A. baumannii*、*A. pittii*、*A. lwoffii*、*A. dijkshoorniae*、*A. haemolyticus*、*A. bereziniae* と複数の菌種で検出されているが、*A. variabilis* での検出は本研究での報告が初めてであり、アシネトバクテリウム属の多菌種が保有しうるプラスミドであると考えられた。得られたプラスミドのレプリコンタイピングを *in silico* で実施したが、ほとんどがこれまでに提唱されたタイプには属さなかった。本研究で得られたプラスミド配列データは、アシネトバクテリウム属のプラスミドレプリコンタイピング手法の拡充やカルバペネマーゼ遺伝子の拡散機構の解明に有用と考えられた。さらに詳細な比較解析を実施している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 M Hayashi, K Kawamura, M Matsui, M Suzuki, S Suzuki, K Shibayama, Y Arakawa	4. 巻 95
2. 論文標題 Reduction in chlorhexidine efficacy against multi-drug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> international clone II	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Hospital Infection	6. 最初と最後の頁 318-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jhin.2016.12.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M Matsui, M Suzuki, M Suzuki, J Yatsuyanagi, M Watahiki, Y Hiraki, K Fumio, A Tsutsui, K Shibayama, S Suzuki	4. 巻 62
2. 論文標題 Distribution and molecular characterization of <i>Acinetobacter baumannii</i> international clone II lineage in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e02190-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.02190-17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野竹重幸、松井真理、鈴木里和、阿部真理子、杉江麻真、上田敦夫、中村浩司、鈴木広道、菅井基行
2. 発表標題 ギラン・バレー症候群患者の血液培養から検出されたNDM-1産生 <i>Acinetobacter variabilis</i> の解析
3. 学会等名 第31回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 蘭牟田直子、川村英樹、児玉祐一、茂見茜里、荒川宜親、菅井基行、西順一郎、鈴木里和、松井真理、甲斐久美子、鹿住祐子、飯島杏奈、川村久美子、鈴木匡弘、郡山豊泰、福山竜子、舞木公子、中山浩一郎、御供田睦代、大岡 唯祐
2. 発表標題 IMP-1産生多剤耐性 <i>Acinetobacter</i> 属菌の遺伝子タイピングとプラスミド・レプリコンタイピング
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井真理
2. 発表標題 多剤耐性アシネトバクターの分子疫学
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 明日美, 松井 真理, 内山 淳平, 松井 秀仁, 花木 秀明, 林 俊治
2. 発表標題 Acinetobacter baumanniiのresistance islandの遺伝子解析
3. 学会等名 第29回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口 明日美, 阪口 義彦, 松井 真理, 小林 秀丈, 内山 淳平, 小山内 洋子, 松井 秀仁, 花木 秀明, 林 俊治
2. 発表標題 関東の医療施設で分離されたAcinetobacter baumanniiの分子疫学的解析
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口 明日美, 阪口 義彦, 松井 真理, 内山 淳平, 松井 秀仁, 花木 秀明, 小林 秀丈, 小山内 洋子, 林 俊治
2. 発表標題 Acinetobacter baumanniiの同定方法の比較検討
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井真理
2. 発表標題 アシネトバクター属の分子疫学と薬剤耐性
3. 学会等名 第99回日本細菌学会関東支部会 ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----