

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10026

研究課題名(和文) 薬剤耐性アシネトバクターのゲノム疫学解析による耐性機構の解明

研究課題名(英文) Molecular epidemiology of drug-resistant Acinetobacter

研究代表者

金子 幸弘 (Kaneko, Yukihiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90469958

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)：本研究では、科学的・効率的な感染制御の実践に寄与することを目指し、1) アシネトバクター属細菌の全ゲノム解析による耐性遺伝子の網羅的検出と解析(ドラフトゲノム解析、MLST解析、POT解析)および薬剤感受性、2) 新規耐性因子の探索と解析、3) コリスチン耐性菌を指示菌とする新しい抗菌薬探索法の確立、4) プラスミドデータベースの作成を行った。1)に関しては、3つのカルバペネマーゼを保有する臨床分離株(OCUAc16株)や、15種以上のプラスミドを保有する臨床分離株(OCUAc18株)といった世界的にも希少な株を同定した。また、標準株であるATCC19606株の全ゲノム解析も完了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アシネトバクター属細菌の全ゲノム解析による耐性遺伝子の網羅的検出と解析(ドラフトゲノム解析、MLST解析、POT解析)および薬剤感受性によって、科学的・効率的な感染制御の実践に寄与した。また、コリスチン耐性菌を指示菌とする新しい抗菌薬探索法の確立し、増加傾向にあるグラム陰性薬剤耐性菌に対する新規抗菌薬のシーズが得られた。また、3つのカルバペネマーゼを保有する臨床分離株(OCUAc16株)や、15種以上のプラスミドを保有する臨床分離株(OCUAc18株)といった世界的にも希少な株のプラスミドを解析し、プラスミドデータベースの作成を行った。

研究成果の概要(英文)：We contributed to the practice of scientific and efficient infection control as follows. 1) Comprehensive detection and analysis of resistance genes by whole genome analysis of Acinetobacter bacteria (draft genome analysis, MLST analysis, POT analysis), and drug susceptibility, 2) search and analysis of new resistance factor, 3) establishment of new antibacterial drug search method using colistin resistant bacteria as an indicator strain, and 4) construction of plasmid database. Regarding 1), we have identified clinically rare strains in the world such as a clinical isolate (OCUAc16 strain) that have three carbapenemase and a clinical isolate (OCUAc18 strain) that have more than 15 kinds of plasmids. In addition, complete genome analysis of the reference type strain ATCC 19606 was completed.

研究分野：感染症

キーワード：薬剤耐性菌 プラスミド 全ゲノム解析 アシネトバクター 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

(1) 効率的な感染制御の実践を目的として、全ゲノム解析に取り組んでいる

多剤耐性アシネトバクター (MDRA) が 2014 年 9 月より 5 類感染症 (全数) に指定され、耐性菌の問題が G7 でも取り上げられる中、申請者は、耐性菌の課題解決や効率的な感染制御の実践等を目的として、本学医学研究科内に感染症科学研究センターを立ち上げた。その一環として、当研究室では、本学附属病院検査部と協力し、患者血液、喀痰等由来のアシネトバクターの収集と解析を行ってきた。これまでの成果として、日本を含めこれまで韓国以外でほとんど分離例のないコリスチン耐性菌種 *Acinetobacter* gs 13BJ/14TU (現在、*Acinetobacter colistiniresistens* に変更) (OCU_Ac7 株) を単離・同定した (Takizawa E. et al. Intern Med. 2016)。また、患者の気管内吸引試料から分離されたカルバペネム耐性株 (OCU_Ac16a 株) の全ゲノム解析を行った結果、驚くべきことに 3 つのカルバペネマーゼ遺伝子を同時に保有する稀な耐性菌であることを明らかにした (Oinuma K. et al. Genom Announc. 2016)。いずれも全く予想されていなかった結果であるとともに、コリスチンやカルバペネムは、アシネトバクターを含むグラム陰性桿菌に対する最後の砦ともいえる抗菌薬であり、国内外の医療関係者に警鐘を鳴らす重要な発見と考えられた。

(2) 耐性菌の出現状況を把握することがなぜ重要か

申請者は、世界でも稀または未確認の耐性菌が次々と比較的容易に発見される上記の状況を受け、今回の発見は実際には氷山の一角であり、新しいタイプの耐性菌の蔓延は、水面下で着実に進行しているものと推測した。また、耐性遺伝子の多くはプラスミドやトランスポゾンなどの可動性の遺伝子上にコードされており、新規な耐性因子保有菌の侵入と定着を許せば、それらガリザーバーの役割を果たし、同菌種はもとより他種の病原菌にも急速に拡大する恐れがある。従って、そのような菌の出現を防ぐまたは排除するための対策を立てる必要があるが、その前提として、実際の耐性菌の出現・蔓延状況を正確に把握することが不可欠である。また、2016 年 4 月に薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランが提示され、基礎研究の重要性も示されていた。

(3) 全ゲノム解析の必要性と有用性

既知の耐性因子であっても、多くの亜型や多型があり、全耐性遺伝子を従来の PCR 法で対応することは現実的ではない。一方、全ゲノム解析で得られる情報は網羅的であり、原理的に既知の耐性遺伝子を見落とすは起こらず、新規耐性遺伝子を推測する糸口ともなる。事実、前述の OCU_Ac16a 株もゲノム情報を手がかりに、ロングシーケンスを実施し、カルバペネマーゼ遺伝子 (TMB-1、NDM-1、OXA-58) の局在も解明しえた。以上の経緯から、全ゲノム解析は、本研究で目標に掲げる耐性因子の蔓延状況の全容解明には必須であり、埋もれている課題を新たに発掘する最も強力な方法であることが再認識された。

2. 研究の目的

全ゲノム解析は網羅的に遺伝子を検出する強力なツールであり、近年は、国策として臨床ゲノム情報データストレージの整備も求められている。本研究では、科学的・効率的な感染制御の実践に寄与する臨床ゲノムデータベースの構築を目指し、耐性化が問題となりつつあるアシネトバクターを対象として、全ゲノム解析と解析結果に基づく以下の検討を実施した。

(1) 全ゲノム解析による網羅的遺伝子検出の実施。

本学附属病院で感染症の原因菌として検出されたアシネトバクターに対して全ゲノム解析を実施し、それらの菌がどのような耐性因子を保有しているのかを明らかにする (これまでに、16 症例 19 株を収集しており、さらに新規で 5-10 例/年程度の解析を見込んでいる)。また、症例の解析と菌の薬剤感受性の測定を行い、発見した因子がどの程度耐性や重症化に寄与しているかを検討する。これらの解析により、耐性因子のリスト化を行うとともに、これまでに国内で報告のない耐性因子の蔓延状況と臨床的重要性を明らかにする。また、*Acinetobacter baumannii* の標準株 ATCC19606 株の全ゲノムを解明する。

(2) 耐性因子のリスト化と、耐性菌の出現・蔓延状況の正確な把握。

カルバペネマーゼを含め、薬剤耐性に関わるタンパク質は、構造と機能が精密に調整されており、一アミノ酸残基の違いが耐性への寄与の度合いに大きな違いをもたらすことは稀ではない。配列の異なる亜種・亜型は次々に報告されているが、それらの機能を配列から断定することは困難である。そこで、ゲノム解析結果から、既知配列に類似しているが配列が部分的に異なる遺伝子を抽出し、その活性をタンパク質レベルで解析する。具体的には、遺伝子を大腸菌で発現させた後、無細胞抽出液を用いて酵素活性を測定する。また、遺伝子を発現させた組換え菌にどの程度の耐性を与えるかにより、活性を評価する。以上のように、従来見落とされてきた遺伝子を、新規耐性因子として発見・リスト化できれば、アシネトバクターの薬剤耐性メカニズムの全容解明に大きく貢献すると期待される。

(3) 新規の耐性遺伝子の検出と耐性機構や伝達性の解明。

Acinetobacter baumannii におけるコリスチン耐性の責任遺伝子として、*lpxABC* や *pmrB* が知られているが、コリスチン耐性菌種 *Acinetobacter colistiniresistens* (OCU_Ac7 株) の耐性機構はこれまでに未報告である。全ゲノム情報から耐性機構を予測するとともに、コリスチンの標的である LPS 欠損・修飾の有無について検討する。また、コリスチン耐性には、LPS 欠損・修飾がしばしば関与するが、LPS は代表的な病原体関連分子パターンであり、病原性とも関連

している。耐性菌の培養細胞やマウスに及ぼす影響を解析することにより、耐性と病原性との関連を解明する。さらに、耐性遺伝子がプラスミド性の場合、伝達性と伝達可能な菌種の範囲が、感染制御を考える上で重要である。全ゲノム解析により、3つのカルバペネマーゼを有する *A. baumannii* OCU_Ac16a 株の耐性因子が、染色体性かプラスミド性を確認し、プラスミド性の場合には伝達性を確認する。

3. 研究の方法

(1) 本学医学部附属病院から分離された臨床分離株の収集

すでに収集した16例(19株)に加え、本学附属病院では、血液由来のアシネトバクターが3~10株/年の頻度で分離されていることから、血液由来株5例、それ以外の株5例を目標として、菌株を収集する。薬剤感受性についてもE-testによる再確認を行う。

(2) 全ゲノム解析

本学でDNA抽出まで実施し、国立感染症研究所で次世代シーケンサー(MiSeq)による全ゲノム解析を行う。13株については菌種同定とMLST解析を実施済みであり、他の株についても、遺伝子配列に基づく系統解析により菌の由来(海外流行株、新規の株など)を明らかにする。

(3) 耐性遺伝子解析

耐性検索ツールであるResFinderにより、耐性遺伝子の検出を行う。また、必要により、耐性遺伝子の局在(染色体性・プラスミド性)を明らかにするために、ロングシーケンス(PacBio)解析を行う。

(4) 伝達性の確認

ロングシーケンスにより染色体性・プラスミド性を分別し、プラスミド性では伝達性の確認を実施した。

4. 研究成果

(1) 全ゲノム解析による耐性遺伝子の網羅的検出と解析:アシネトバクターの全ゲノム解析を実施した。血液分離株の13株については、菌種同定、患者背景、遺伝子解析(ドラフトゲノム解析、MLST解析、POT解析)、薬剤感受性の測定を完了し、論文発表を行った(Oinuma KI. et al. Jpn J Infect Dis. 2019)(図1)。

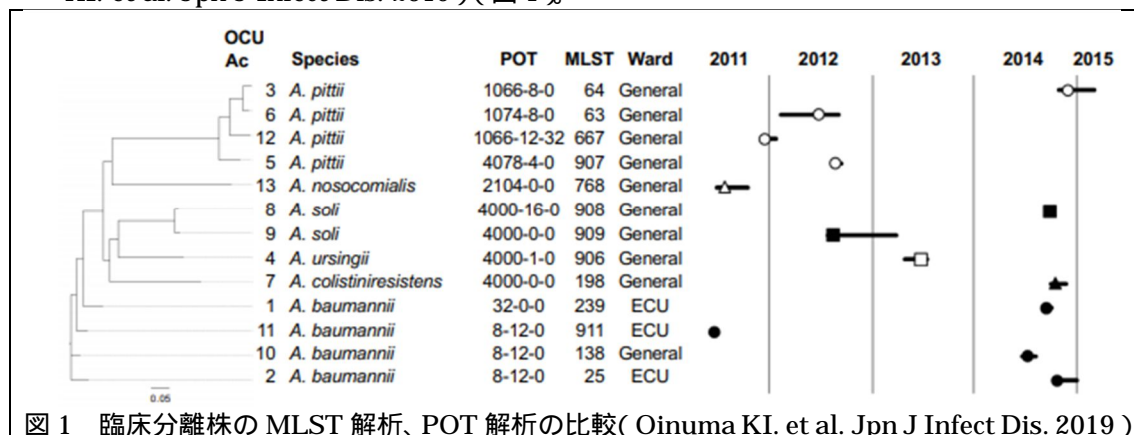


図1 臨床分離株のMLST解析、POT解析の比較(Oinuma KI. et al. Jpn J Infect Dis. 2019)

- (2) 新規耐性因子の探索と解析:これまでに解析したゲノムの中から、新たにカルバペネマーゼ活性の可能性を有する耐性因子発見の手がかりを得て、耐性誘導を行い、カルバペネム耐性化した株に関してカルバペネマーゼ活性を測定した。カルバペネマーゼ活性は見られなかったが、容易にカルバペネムに耐性化する株が見つかり、遺伝子変化も含めた詳細な解析を実施する予定とした。
- (3) 耐性機構と病原性の解析:コリスチン耐性菌種 *Acinetobacter colistiniresistens*(OCU_Ac7株)の耐性機構に迫るため、全ゲノム解析からの耐性機構予測を行った。2つ目として誘導されるコリスチン耐性の耐性機構の解析を実施した。耐性度の異なる複数のコリスチン耐性株を取得し、ドラフトゲノム解析を実施した結果、多彩な遺伝子変異が確認された。3つ目として、コリスチン耐性菌を指示菌とする新しい抗菌薬探索法を確立し、新しい抗菌物質候補を取得した。
- (4) カルバペネム高度耐性のアシネトバクターに関する検討:完全ゲノムを決定し、耐性因子の局在(染色体及びプラスミド)を同定した。また、NDM-1が容易に多菌種に伝達することを確認した。さらに、追加した12株のうち、多剤耐性菌については、完全ゲノムを決定した。
- (5) *Acinetobacter baumannii*の標準株 ATCC19606株の全ゲノム解析を行うことで、今後の効率的なゲノム解析の基盤を構築した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oinuma KI, Suzuki M, Nakaie K, Sato K, Saeki K, Sakiyama A, Takizawa E, Niki M, Niki M, Yamada K, Shibayama K, Kakeya H, Kaneko Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome-based epidemiological analysis of 13 Acinetobacter strains isolated from blood cultures of hospitalized patients from a university hospital in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2018.403.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Y, Oinuma KI, Terachi T, Arimura Y, Niki M, Yamada K, Kakeya H, Mizutani T	4. 巻 57
2. 論文標題 Successful Treatment of Intestinal Mycosis Caused by a Simultaneous Infection with Lichtheimia ramosa and Aspergillus calidoustus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 2421-2424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.0254-17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsubouchi T, Suzuki M, Niki M, Oinuma KI, Niki M, Kakeya H, Kaneko Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Acinetobacter baumannii ATCC 19606T, a Model Strain of Pathogenic Bacteria Causing Nosocomial Infection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Resour Announc	6. 最初と最後の頁 e00289-20.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00289-20.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子 幸弘
2. 発表標題 わが国の現状
3. 学会等名 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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子 幸弘
2. 発表標題 我が国における耐性菌の現状
3. 学会等名 日本臨床検査自動化学会第50回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪内 泰志, 小山 純弘, 金子 幸弘
2. 発表標題 薬剤耐性菌対策に向けた海洋微生物資源ライブラリの構築
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子 幸弘
2. 発表標題 微生物の基本を知る：耐性はどのように広がしやすいのか？
3. 学会等名 第34回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 老沼 研一, 鈴木 仁人, 佐伯 康匠, 坪内 泰志, 仁木 満美子, 山田 康一, 柴山 恵吾, 掛屋 弘, 金子 幸弘
2. 発表標題 当院で分離されたカルバペネム高度耐性Acinetobacter baumannii株のカルバペネマーゼ遺伝子の周辺構造と接合伝達性
3. 学会等名 第53回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榮山 新, 老沼 研一, 金子 幸弘
2. 発表標題 アシネトバクター属細菌の内因性因子によるカルバペネム耐性獲得機構の解析
3. 学会等名 第53回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榮山 新, 老沼 研一, 鈴木 仁人, 佐藤 佳奈子, 佐伯 康匠, 中家 清隆, 滝沢 恵津子, 仁木 誠, 仁木 満美子, 山田 康一, 柴山 恵吾, 掛屋 弘, 金子 幸弘
2. 発表標題 血液由来のAcinetobacter baumanniiのPOT法とMLSTによる遺伝子型の比較
3. 学会等名 第87回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第60回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第65回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 老沼 研一, 鈴木 仁人, 佐藤 佳奈子, 佐伯 康匠, 中家 清隆, 滝沢 恵津子, 仁木 誠, 仁木 満美子, 山田 康一, 柴山 恵吾, 掛屋 弘, 金子 幸弘
2. 発表標題 NDM型とTMB型の2種のメタロ-β-ラクタマーゼを有するアシネトバクター属臨床分離株の発見と解析
3. 学会等名 第87回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第60回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第65回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榮山 新, 老沼 研一, 鈴木 仁人, 佐藤 佳奈子, 佐伯 康匠, 中家 清隆, 滝沢 恵津子, 仁木 誠, 仁木 満美子, 山田 康一, 柴山 恵吾, 掛屋 弘, 金子 幸弘
2. 発表標題 散発事例でのAcinetobacter baumanniiにおけるPOT法とMLSTでの遺伝子型の相違
3. 学会等名 第52回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 老沼 研一, 鈴木 仁人, 佐藤 佳奈子, 佐伯 康匠, 中家 清隆, 滝沢 恵津子, 仁木 誠, 仁木 満美子, 山田 康一, 柴山 恵吾, 掛屋 弘, 金子 幸弘
2. 発表標題 当院で分離されたカルバペネム高度耐性アシネトバクター株の耐性因子の特定と解析
3. 学会等名 第52回緑膿菌感染症研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪市立大学大学院医学研究科細菌学ホームページ 業績 http://www.med.osaka-cu.ac.jp/bacteriology/research_achievements/research-achievement.shtml</p>
--

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
研究分担者	仁木 満美子 (Niki Mamiko) (20438229)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	老沼 研一 (Oinuma Kenichi) (20635619)	大阪市立大学・大学院医学研究科・助教 (24402)	
研究分担者	掛屋 弘 (Takeya Hiroshi) (40398152)	大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	鈴木 仁人 (Suzuki Masato) (70444073)	国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官 (82603)	
連携 研究者	坪内 泰志 (Tsubouchi Taishi) (30442990)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	