

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10040

研究課題名（和文）大規模アウトブレイクの原因となった薬剤耐性菌は、地域への蔓延をもたらしたのか？

研究課題名（英文）Have the drug-resistant bacteria that caused the large-scale nosocomial outbreak brought epidemic spread in the region?

研究代表者

河原 隆二（Kawahara, Ryuji）

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主幹研究員

研究者番号：10332454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：大阪府内で広く分離されるIMP-6遺伝子保有カルバペナム耐性大腸菌及び肺炎桿菌について、特定の医療機関でのアウトブレイクと関連があるのかどうか、また広がった要因としてIMP-6遺伝子が格納されたプラスミドが関与していたのかどうかを検討した。菌株とプラスミドの全配列の比較を行った結果、アウトブレイク事例と地域に広がった株と関連性があったことが示唆された。また、市販食肉から同様の菌株が1株検出されており、この株についても同様に関連性を示す結果となった。これらがどのように地域内に広がったのか詳細は明らかにできなかったが、このアウトブレイク事例が地域内への薬剤耐性菌の拡散に寄与したことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、地域内の薬剤耐性菌がどのように広がっていったのか、その要因を明らかにすることである。薬剤耐性遺伝子を持つプラスミドは菌株から菌株への伝達経路として重要であると言われてきたが、実際に地域内での耐性菌拡大に寄与していたことを証明するのは困難であった。今回、全ゲノム解析という手法を用いてプラスミドを解析することで、薬剤耐性プラスミドの拡散が、地域内での薬剤耐性菌の蔓延の要因の一つであったことを示す結果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We determined whether carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* carrying the IMP-6 gene, which are widely isolated in Osaka Prefecture, were associated with the huge outbreak at a hospital in Osaka, and whether plasmids containing the IMP-6 gene were involved as a factor in their spread. Comparison of the strains by PFGE and the full sequence of plasmids suggested that there was an association between the outbreak cases and the strains that spread in the region. In addition, one similar strain was detected in retail meat, and also related with the strains. Although the details of how these strains spread throughout the region are not known, it is suggested that the outbreak case contributed to the spread of drug-resistant bacteria in the region.

研究分野：病原細菌学

キーワード：薬剤耐性菌 カルバペナム耐性腸内細菌 CRE プラスミド ゲノム解析 IMP-6

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）とは、グラム陰性菌に対する「最後の切り札」であるカルバペネム系抗菌薬に耐性を獲得した、大腸菌や肺炎桿菌などの腸内細菌科細菌の総称である。CREのうち、何らかのカルバペネム分解酵素（カルバパネマーゼ）を産生することによって耐性となるものを「CPE」と呼び、特に注意が必要とされている。その酵素には様々な種類・遺伝子型があり、メタロ-β-ラクタマーゼ（IMP型、VIM型、NDM型など）やセリン型β-ラクタマーゼ（KPC型、OXA-48型、GES型など）に分類され、これらの耐性遺伝子がプラスミドを介して菌から菌へと水平伝播することが、急速な感染拡大に寄与していると言われている。

日本国内におけるCREは諸外国よりも少なく、他の耐性菌と比べても比較的良好な状況とされてきた。しかしながら、我々は2015～2016年に大阪府北部地域の医療機関の入院患者約1500名のうち、11.8%の便検体からIMP-6産生CRE（大腸菌および肺炎桿菌）が検出されることを明らかにした。また、2009年以降に大阪府内23医療機関で検出されたCRE疑いの147株（肺炎桿菌71株、大腸菌52株、その他24株）について解析を実施したところ、IMP-6産生株が多く（84.0%）、さらに2013年以降大幅に増加してきていることも報告した。国内の他の地域でもIMP-6産生CREはしばしば報告されているが、散発や病院単位でのアウトブレイクの事例であり、このような地域での蔓延についての報告はない。

現在の大阪地域におけるCRE蔓延を生じた要因として、大阪地域のある基幹医療機関で発生した大規模アウトブレイクが要因となったことが想定された。このアウトブレイクは、大阪市内の医療機関で2010年7月から2014年3月までに114人のIMP-6産生CREの感染者が発生した事例で、「薬剤耐性プラスミドによるアウトブレイク」であったために探知が遅れ、4年間にわたり集積したと報告されている。当該医療機関が地域内の中核的な医療機関であったこと、さらに、この事例とほぼ同時期に大阪地域でIMP-6産生CREの検出が始まり、その後増加していったことから、保菌者の転院等により周辺地域に株が拡散した可能性が考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究の目的として、このIMP-6産生CREを対象に、「アウトブレイクの原因となった薬剤耐性菌は、地域への蔓延を引き起こしたか？」を証明することを想定した。

先行研究で地域内の菌株が極めて多様であったことから「単純なクローンの拡散」ではなく、「薬剤耐性プラスミドによるアウトブレイク」が地域内で生じたこと示唆されており、株そのものではなく、IMP-6遺伝子が乗った薬剤耐性プラスミド（*bla*_{IMP-6} プラスミド）にフォーカスすることで、地域内でどのように広がっていったかを検討することとした。

3. 研究の方法

先行研究で用いたCRE分離株、さらに2009年の市販食肉（合挽き肉）由来肺炎桿菌1株からIMP-6が検出されたため、これも加えて以降の解析に用いた。PFGE（Pulsed-Field Gel Electrophoresis）を実施した。また、制限酵素にS1 nucleaseを用いたS1-PFGE法及びサンハイブリダイゼーションを実施し、*bla*_{IMP-6} プラスミドのサイズ及びレプリコン型を推定した。これらのデータから、同一～関連したクローン株は除き、できるだけ多様な株となるように菌株を抽出した。

申請時には抽出したプラスミド DNA の配列データを取得することを想定していたが、データの精度や手技に問題があったため、各株の全ゲノム配列を取得して解析に用いた。外部機関に委託して MiSeq または HiSeq (Illumina 社) によるショートリードシーケンシングを行い、さらにロングリードシーケンサーである PacBio RS II (PacBio 社) または MinION (Oxford Nanopore Technologies 社) を用いてゲノム配列を取得した。これらのデータについてハイブリッドアセンブリを行うことで、完全長の *bla*_{IMP-6} プラスミド配列を構築し、それを以降の解析に用いた。

得られたプラスミド配列に、Genbank より取得した基幹医療機関の大規模アウトブレイク事例由来株のプラスミド配列を加え、プラスミドの比較解析を行った。roary ソフトウェアを用いて対象としたプラスミドにコードされるすべての遺伝子を抽出し、それぞれのプラスミドの各遺伝子の保有状況をバイナリデータとして書き出した。このデータから GrapeTree ソフトウェアで Minimum Spanning Tree を作成した。プラスミドの構造比較解析は Proksee ウェブサイトにて実施した。

また、研究期間中に新たに解析した CRE 株のうち、新規または報告の稀なものについて、細菌学的解析や同様に全ゲノム解析を実施した。

4. 研究成果

これまでに構築した 875 株の CRE データベースから、PFGE を実施した IMP-6 遺伝子保有の大腸菌及び肺炎桿菌 409 株について検討を行った。PFGE のパターンはいずれの菌種においても多様となったが、肺炎桿菌では同一～関連した菌株が多い傾向を示した。また、*bla*_{IMP-6} プラスミドのサイズは 50 kpb 程度、レプリコン型は IncN である株が多数を占めたものの、30～200 kbp と様々なサイズを持つプラスミドや IncF を持つものも検出された。これに対し、2010～2014 年の大規模アウトブレイク事例由来 6 株のプラスミド配列はすべて IncN (うち 1 株は IncR とのハイブリッド型) でサイズも 50 kpb 付近であった。この結果はアウトブレイク事例以降、*bla*_{IMP-6} プラスミドが様々な変異をおこしながら、地域内に広がっていったことを示唆するものであった。

また、2009 年に食肉から分離した第三世代セファロスポリン耐性大腸菌および肺炎桿菌 165 株について、カルバペネマーゼ遺伝子のスクリーニングを行ったところ、IMP-6 遺伝子保有肺炎桿菌が 1 株検出された。この株からの *bla*_{IMP-6} プラスミドも約 50 kpb 程度の IncN プラスミドであった。アウトブレイク事例や地域内の蔓延以前に分離されており、当時はまだ CRE が医療機関でもほとんど問題となっていなかったことを考慮すると、なぜこのような株が食肉から検出されたのかは興味深い結果である。元々の由来となった食肉は、大阪府内のスーパーで市販されていたハンバーグ用合挽き肉であり、元々の食肉そのもの、または加工段階でヒトを介しての污染したのかは不明である。なお、2020 ～ 2021 年にかけて同様に食肉及び家畜から分離した各種薬剤耐性菌 587 株からは IMP-6 遺伝子は検出されておらず、その後同様の薬剤耐性菌が食肉などで拡散した恐れはないと考えられた。

全ゲノム解析の結果、25 株について *bla*_{IMP-6} プラスミドの全長配列が取得できた。これらに基幹医療機関の大規模アウトブレイク事例由来株のプラスミド配列、リファレンスとして pKPI-6 (2008 年分離肺炎桿菌由来 *bla*_{IMP-6} プラスミド) の配列とを加え、プラスミドの比較解析を実施した (図 1)。この結果から、アウトブレイク株由来の一つが pKPI-6 と類似しており、さらにここを中心に幾つかの地域由来株のプラスミドが近縁であることが示唆された。なお、IncF プラスミドやサイズが大きく異なるものは図中の距離として離れて配置されており、妥当な結果

であると考えられた。また、図中の「Meat (濃いオレンジ)」で示した食肉由来株のプラスミド (p0907-09_IMP6) は、pKPI-6 近縁のグループに比較的近くに分類された。

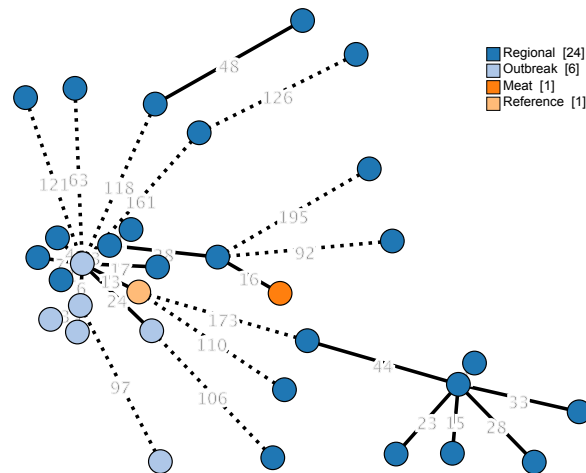
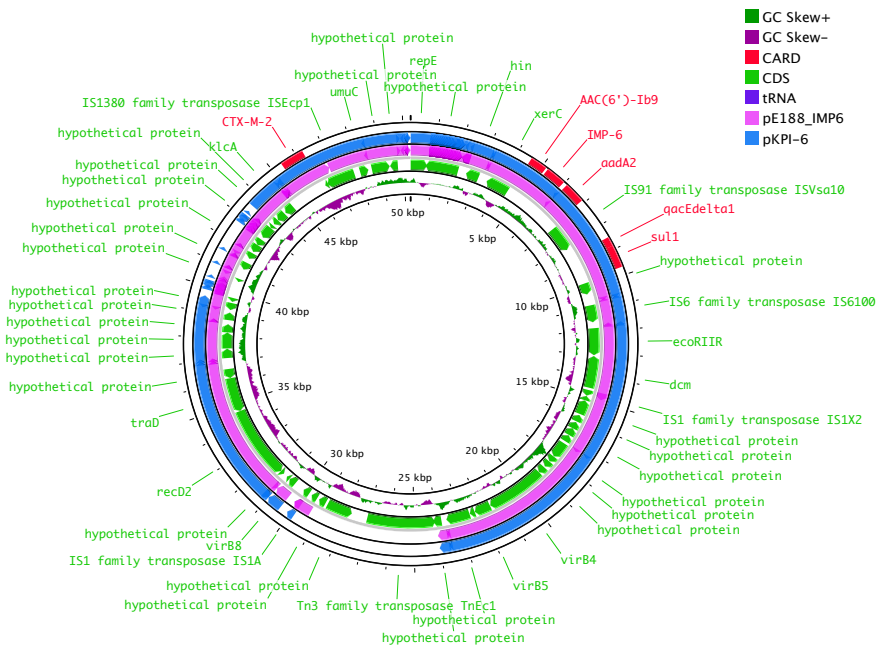


図 1. *bla*_{IMP-6} プラスミドの Minimum Spanning Tree 解析結果 (数値は距離)

さらに p0907-09_IMP6 プラスミドについて、構造比較解析を行った。比較対象としては、pKPI-6 と類似度が高かった地域由来株のもの (pE188_IMP6) を用いた。図 2 に示したように、これらのプラスミド構造の大半が類似しており、特に pE188_IMP6 とはトランスポゾンが挿入されている領域以外は酷似していることが明らかとなった。したがって、食肉由来の p0907-09_IMP6 プラスミドが地域の IMP-6 蔓延と何らかの関連性があったことが示唆されたが、前述した通りその汚染経路などは不明であり、詳細は明らかとはならなかった。



p0907-09_IMP6 (length=50282)

図 2. 食肉から分離された肺炎桿菌由来の *bla*_{IMP-6} プラスミドの構造解析

以上、大阪地域での IMP-6 保有 CRE の蔓延は、アウトブレイク事例と関連して発生したことが推測される結果となった。しかしながら、全配列が取得できたプラスミドの数が限定されており、今後より詳細な解析が必要であると思われた。

また本研究を通じて、カルバペネーゼ遺伝子のスクリーニング及び IMP 遺伝子の型別法の開発、大阪府内で検出された KHM-1 株の解析や新規 FRI 遺伝子の同定などを実施し、各プラスミドの構造などについて報告を行った。

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 Kawahara Ryuji, Watahiki Masanori, Matsumoto Yuko, Uchida Kaoru, Noda Makiko, Masuda Kanako, Fukuda Chiemi, Abe Yuki, Asano Yukiko, Oishi Kazunori, Shibayama Keigo, Shinomiya Hiroto	4. 巻 -
2. 論文標題 Subtype screening of blaIMP genes using bipartite primers for DNA sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	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.2020.926	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 Umeda Kaoru, Nakamura Hiromi, Fukuda Akira, Yamaguchi Takahiro, Matsumoto Yuki, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Kawahara Ryuji	4. 巻 15
2. 論文標題 Molecular characterization of blaKHM-1 encoding plasmid in an Enterobacter hormaechei subsp. hoffmannii isolate from blood culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0227605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0227605	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 Watahiki Masanori, Kawahara Ryuji, Suzuki Masahiro, Aoki Miyako, Uchida Kaoru, Matsumoto Yuko, Kumagai Yuko, Noda Makiko, Masuda Kanako, Fukuda Chiemi, Harada Seiya, Senba Keiko, Suzuki Masato, Matsui Mari, Suzuki Satowa, Shibayama Keigo, Shinomiya Hiroto	4. 巻 73
2. 論文標題 Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 166～172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2019.041	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6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河原隆二
2. 発表標題 地方衛生研究所における薬剤耐性菌検査・研究とその結果から見えるもの
3. 学会等名 第63回日本感染症学会中日本地方会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原隆二, 山口貴弘, 安達史恵, 安楽正輝, 川津健太郎
2. 発表標題 大阪府内で分離されたmCIM陽性Enterobacter cloacae complex 株の解析
3. 学会等名 第49回 薬剤耐性菌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤谷好弘, 明田幸宏, 西功, 河原隆二, 朝野和典
2. 発表標題 便のスクリーニング検査で検出されたIMI-1産生Enterobacter bugandensisの分子遺伝学的解析
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 安達史恵, 関塚剛史, 山口進康, 倭正也, 福岡京子, 黒田誠, 河原隆二
2. 発表標題 大阪府内で分離されたFRI型カルバペネマーゼ産生Enterobacter属菌のゲノム解析
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 河原隆二, 綿引正則, 内田薫, 松本裕子, 高橋志保, 野田万希子, 増田加奈子, 福田千恵美, 原田誠也, 浅野由紀子, 鈴木仁人, 松井真理, 鈴木里和, 菅井基行, 四宮博人
2. 発表標題 カルバペネマーゼ遺伝子スクリーニング用マルチプレックスPCR法の開発とin silico評価
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 河原隆二
2. 発表標題 地方衛生研究所で行ってきた薬剤耐性菌に関する研究～行政的取り組み
3. 学会等名 第48回薬剤耐性菌研究会（招待講演）
4. 発表年 2019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
研究分担者	中村 寛海 (Nakamura Hiromi) (00332445)	地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主幹研究員 (84407)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------