

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09670

研究課題名(和文) 尿路感染症における網羅的薬剤耐性機構の研究

研究課題名(英文) Research for comprehensive antibiotic resistance mechanism 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：広域抗菌薬であるカルバペネム系抗菌薬、セフェム系抗菌薬、キノロン系抗菌薬に耐性を示す大腸菌と肺炎桿菌について調査を行い、既存の耐性菌との特徴の差異を報告した。特にカルバペネム耐性菌の調査においては、新たな耐性の傾向を発見した。本邦のカルバペネム耐性菌ではIMP-6という薬剤分解酵素の産生が主要な耐性の仕組みとされているが、本研究では外膜透過性の変化がIMP-6産生と重複して働き、高度耐性に関与していることを発見した。また本邦で分離された高病原性とセフェム系への耐性を同時に示す肺炎桿菌の分子疫学的特徴、インドネシアで分離された肺炎桿菌のキノロン耐性率の高さを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IMP-6産生株における外膜透過性変化の、カルバペネム耐性への寄与を報告したのは本研究が初めてであり、この結果はAntibiotics. (2022)に掲載された。また近年検出が増加している、高い病原性を保持しながら薬剤耐性を示す肺炎桿菌では、非病原性の株と比較して高度な薬剤耐性をもち、その危険性が示された。加えてインドネシアの肺炎桿菌を解析した結果、本邦の同種菌と比較してキノロン系抗菌薬への高い耐性率を保有しており、その動向をモニタリングする必要性を示された。これらの研究結果は今後の耐性菌対策、治療薬の開発への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae, resistant to the broad-spectrum antimicrobials that carbapenems, cepheems and quinolones, were investigated and differences in their characteristics from existing resistant strains were reported. In particular, a new resistance trend was found in the survey of carbapenem-resistant E. coli. In Japanese carbapenem-resistant bacteria, the production of IMP-6, a drug- hydrolyzing enzyme, is considered to be the main mechanism of resistance. But in this study, we found that changes in outer membrane permeability overlap with IMP-6 production, and are involved in advanced resistance. We also analysed the molecular epidemiological characteristics of K. pneumoniae isolated in Japan that showed both high virulence and resistance to cepheems, and the high rate of quinolone resistance among K. pneumoniae isolated in Indonesia.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路感染症

1. 研究開始当初の背景

近年、本来効くはずの抗菌薬が効かなくなった細菌、薬剤耐性菌が増加している。幅広い細菌に効果のある薬剤であるカルバペネム系抗菌薬やセフェム系抗菌薬、キノロン系抗菌薬への耐性菌は、治療の選択肢が狭まること、プラスミドにより容易に伝播することから特に危険視されている。

(1) カルバペネム耐性菌の薬剤耐性機構は 3 つ知られており、いずれかの機構により耐性を示している。1 つ目は、カルバペネマーゼという酵素の産生による抗菌薬の分解である。2 つ目は、外膜透過性の変化により抗菌薬の細菌内への侵入を妨げる機構である。3 つ目は、排出ポンプの過剰産生による、細菌内からの抗菌薬の排出亢進である¹⁾。本邦ではカルバペネマーゼ産生によるカルバペネム耐性菌が多く、特に IMP-6 という遺伝子型のカルバペネマーゼを産生する菌の検出が多い²⁾。IMP-6 産生菌は同じカルバペネム系抗菌薬でもメロペネムには耐性を示す一方で、イミペネムには感性という、特殊な薬剤感受性を示すことが知られている³⁾。カルバペネマーゼ産生菌において、外膜透過性の変化や排出ポンプの耐性への関与を解析している研究は少なく、IMP-6 産生菌においても例外ではない。そこで我々は IMP-6 産生大腸菌の薬剤感受性および外膜透過性の変化、排出ポンプの耐性への関与について解析を行った。

(2) 肺炎桿菌は主に肺炎、尿路感染症の原因菌であるが、近年、致命的な症状を引き起こす「高病原性を示す肺炎桿菌」が増加している⁴⁾。さらに、治療に使用する薬剤が効かない薬剤耐性肺炎桿菌が増加しており、医療現場における診断、治療を困難にしている。肺炎桿菌には、基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) という薬剤を分解し無効化する酵素を産生することにより、セフェム系抗菌薬に耐性を示す菌が多い⁵⁾。従来の薬剤耐性菌の検査には時間を要するため、初期治療は医師が患者情報などから総合的に判断して薬剤を投与せざるを得ず、結果として治療の失敗や薬剤耐性菌の拡大に繋がっている。そのため臨床現場において迅速かつ正確な薬剤耐性菌の診断が求められている。本研究では、日本の患者から分離された肺炎桿菌に対して薬剤への感受性、薬剤耐性や高病原性に関わる遺伝子を調べ、近年の薬剤耐性化、高病原性化の傾向やそれらの関連を評価した。

(3) インドネシアは本邦との間で年間約 90 万人が往来する近隣国であり、それゆえに国境を超えた耐性菌の伝播が起こり得る⁶⁾。キノロン系抗菌薬は日本とインドネシアで共通して汎用される薬剤だが、日本における感受性と比較して、インドネシアでの感受性は顕著に低いとの報告がある⁷⁾。キノロン耐性の機序は主に二つ知られており、一つ目が染色体上の DNA ジャイレースと DNA トポイソメラーゼ 4 におけるキノロン耐性決定領域 (QRDR) の変異、二つ目がプラスミド媒介キノロン耐性 (PMQR) 遺伝子の保有である^{8), 9)}。この PMQR 遺伝子はプラスミドにより伝播するため、他の薬剤耐性因子である ESBL との関連が指摘されている⁸⁾。アジア地域において、ESBL 産生菌では、非産生菌と比較してキノロン耐性が高いと報告があり、PMQR 遺伝子と ESBL 遺伝子は同じくプラスミド伝播性であるため、ESBL 産生菌における検出率が高い^{10), 11)}。そこで本研究ではインドネシアの ESBL 産生肺炎桿菌を対象にキノロン感受性とその耐性機構を調査した。

2. 研究の目的

(1) IMP-6 型カルバペネマーゼ産生菌における、外膜透過性の変化や排出ポンプの耐性への関与を解析すること。

(2) ESBL 産生肺炎桿菌を対象として、近年の薬剤耐性化、高病原性化の傾向を調査するとともに、それらの関連を評価すること。

(3) インドネシアにおける ESBL 産生 *K. pneumoniae* のキノロン感受性や耐性機構の特徴、および日本との差異について検討すること。

3. 研究の方法

兵庫県で分離されたカルバペネム耐性大腸菌 42 株、肺炎桿菌 107 株および、インドネシアの尿路感染症患者から分離された肺炎桿菌 105 株を収集した。

(1) IMP-6 産生大腸菌の臨床分離株 42 株を対象とした。カルバペネマーゼ産生確認試験でカ

ルバペネマーゼを産生していることを確認したのち¹²⁾、PCR と DNA シークエンスにより遺伝子型を解析することで、IMP-6 産生株と断定した。微量液体希釈法により抗菌薬に対する最小発育阻止濃度 (MIC)、すなわち各株に対して抗菌薬が有効である濃度、を測定し薬剤感受性を確認した¹²⁾。外膜透過性に関与する遺伝子である *ompC*、*ompF* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定し MIC 値との相関をみることで、外膜透過性の変化の薬剤耐性への関与を解析した¹³⁾。排出ポンプ阻害剤を用いた表現型実験により、本株の薬剤耐性に排出ポンプが関与しているかを解析した¹⁴⁾。

(2) 日本で分離された肺炎桿菌 107 株を対象として、10 種類の薬剤に対する感受性を調べた¹²⁾。ESBL 阻害剤を用いて対象株の ESBL 産生の有無を確認し、複数種ある ESBL 産生遺伝子型を PCR 法による解析にて特定した。また、ESBL 産生遺伝子はプラスミドという伝達物質を介して菌から菌へ伝播し、薬剤耐性が拡大するため、PCR 法でプラスミド型を解析し、その伝播形式を調査した。さらに、肺炎桿菌の過剰な粘稠性が高病原性に関与しているとされているため、対象株を培地上での粘稠性により過粘稠性株と非過粘稠性株に群分けを行った¹⁵⁾。PCR 法にて 5 種類の病原性遺伝子の有無を調べ、各株を比較し過粘稠性の高病原性への関与を評価した^{16), 17)}。

(3) 2015 年にインドネシアで採取された尿路感染症由来の ESBL 産生肺炎桿菌 105 株を対象とした。ESBL の産生はクラブラン酸を用いたダブルディスクシナジー法により確認し、CLSI のガイドラインに準じて、ディスク拡散法でナリジクス酸、シプロフロキサシン、レボフロキサシンへの感受性を判定した¹²⁾。QRDR 変異の有無は、*gyrA* および *parC* を標的遺伝子として PCR と DNA シークエンスで探索した。*gyrA* では 83 位と 87 位、*parC* では 80 位と 84 位のアミノ酸変異がキノロン耐性に影響すると知られているため、これらの点について確認した⁸⁾。また PMQR 遺伝子の保有は、*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*aac(6')-Ib-cr*、*qepA* の 5 種の遺伝子について PCR で調査した^{8), 9)}。

4. 研究成果

(1) 対象の大腸菌 42 株全てがいずれかのカルバペネム系抗菌薬に耐性であったが、イミペネムには 21 株が感性であった。先行研究では IMP-6 産生菌は全ての株がイミペネムに感性を示していたことから²⁾、本株では IMP-6 以外の何らかの機構がイミペネム耐性へ関与していることが示唆された。排出ポンプの関与が確認できた株は無かったが、外膜透過性に関与する遺伝子 *ompC*、*ompF* の mRNA 発現量とイミペネムの MIC 値に有意な負の相関が確認された (図 1)。すなわち外膜透過性が低下するほど、イミペネムの MIC が高くなっていった。結論として、外膜透過性の変化が IMP-6 産生と重複して働き、イミペネム耐性に関与していることを発見した。IMP-6 産生株におけるイミペネム耐性、外膜透過性変化の耐性への関与を報告したのは本研究が初めてであり、今後の耐性菌対策、治療薬の開発への貢献が期待できる。

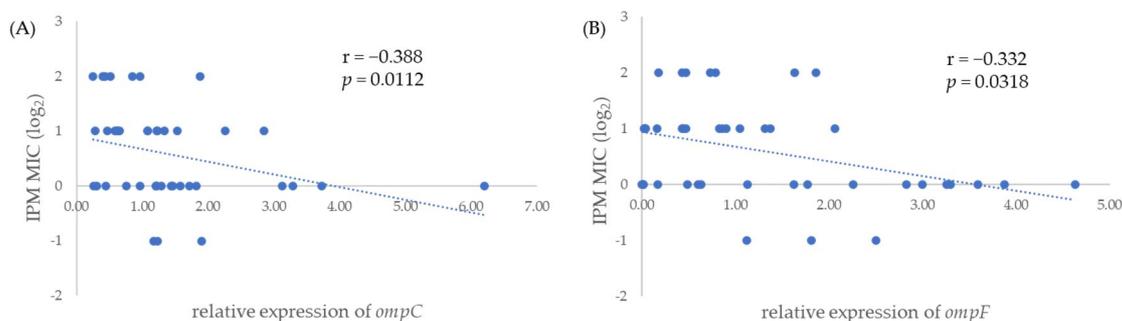


図 1. イミペネム (IPM) の MIC と外膜透過性関連遺伝子 (A; *ompC*、B; *ompF*) の mRNA 発現量の相関

(2) ESBL 産生肺炎桿菌において、過粘稠性株は非過粘稠性株より高い病原性遺伝子保有率と薬剤耐性を示した ($p < 0.05$)。特に病原性遺伝子では *uge*、*wabG*、*rmpA*、*fimH*、薬剤耐性はセフェムおよびピペラシリン/タゾバクタムにおいて過粘稠性株が非過粘稠性株より高頻度であった。このことから、過粘性が高病原性に寄与しており、高病原性肺炎桿菌が高度薬剤耐性化傾向にあることが示唆された (図 2)。また、対象株の ESBL 産生遺伝子型は近年世界的に増加している CTX-M-15 型 (68.2%) が最も多く、世界的な傾向と一致した¹⁸⁾。さらに、FII 型のプラスミドが CTX-M-15 型 ESBL 産生遺伝子の拡大に関与している可能性示唆された ($p < 0.05$)。

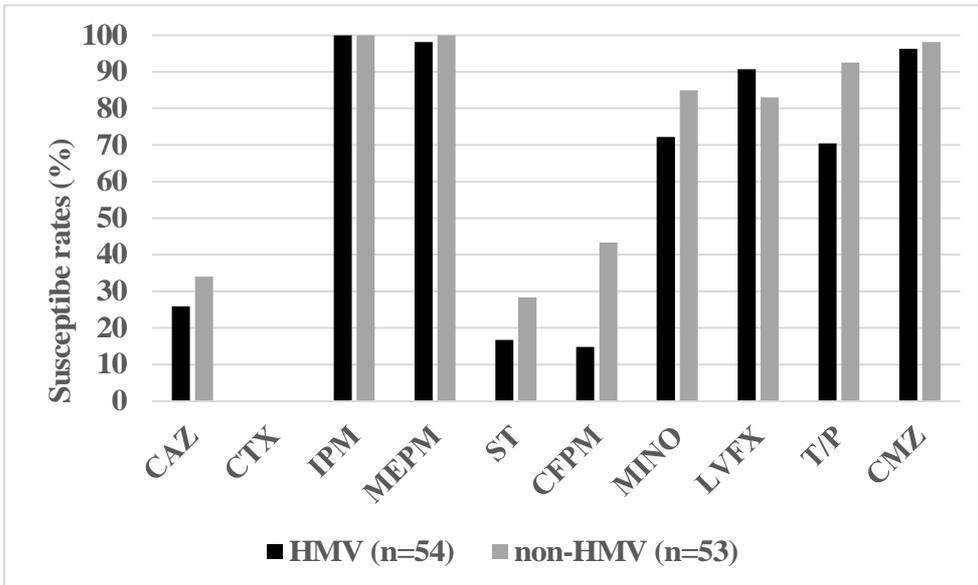


図 2. ESBL 産生肺炎桿菌における過粘稠性群および非過粘稠性群の薬剤感受性比較

*HMV: 過粘稠性株、non-HMV: 非過粘稠性株

縦軸; 感受率、

横軸; 抗菌薬名 [セフトジジム(CAZ)、セフォタキシム (CTX)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MEPM)、スルファメトキサゾール/トリメトプリム (ST)、セフェピム (CFPM)、ミノサイクリン (MINO)、レボフロキサシン (LVFX)、ピペラシリン/タゾバクタム (T/P)、セフメタゾール (CMZ)]

(3) インドネシアで分離された ESBL 産生肺炎桿菌のキノロン系抗菌薬に対する感受率はいずれも 40%以下であった。また 105 株中 91 株がいずれかのキノロン抗菌薬に対して非感性を示した。QRDR 変異は *gyrA* で 52 株、*parC* で 64 株にみられた。PMQR 遺伝子は 89 株が保有しており、*qnrB* と *aac(6)-Ib-cr* を高頻度に見られた。保有する耐性機構のパターンの違いによる感受性の差を、株を 4 つのグループに分けて検討した。PMQR 遺伝子と QRDR 変異の両方を持つ群では、他のグループより感受率が顕著に低かった (図 3)。フィッシャーの正確確率検定の結果、PMQR 遺伝子と QRDR 変異の両方を持つ群では、いずれか一方しか持たない群よりもナリジクス酸とシプロフロキサシンの耐性率が有意に高いことが分かった。本研究のインドネシア株におけるキノロン薬の感受率は、過去の日本における ESBL 産生肺炎桿菌の報告より顕著に低く¹⁹⁾、その原因として PMQR 遺伝子を保有するのみでなく、QRDR 変異のある株が多かったことが影響していると考えられる。

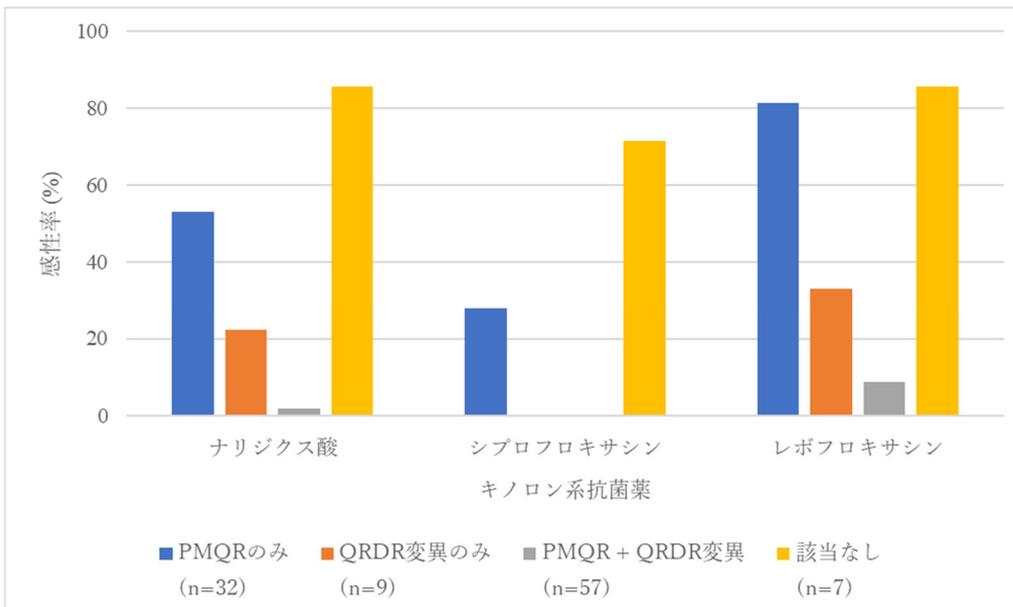


図 3. インドネシアで分離された ESBL 産生肺炎桿菌におけるキノロン耐性機構パターンと薬剤感受性の関係

(4) IMP-6 産生株における外膜透過性変化の、カルバペネム耐性への寄与を報告したのは本研究が初めてであり、この結果は *Antibiotics*. (2022) に掲載された。また近年検出が増加している、高い病原性を保持しながら薬剤耐性を示す肺炎桿菌では、非病原性の株と比較して高度な薬剤耐性を持ち、その危険性が示された。加えてインドネシアの肺炎桿菌を解析した結果、本邦の同種菌と比較してキノロン系抗菌薬への高い耐性率を保有しており、その動向をモニタリングする必要性を示された。これらの研究結果は今後の耐性菌対策、治療薬の開発への貢献が期待できる。

<参考文献>

1. Haidar G, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61: 2017
2. Yamamoto, et al. *J. Hosp. Infect.* 97: 212-217, 2017
3. Kayama, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 1356-1359, 2015
4. Liu C, et al. *Infect Drug Resist* 11: 1031-1041, 2018
5. Kakuta N, et al. *Int J Infect Dis* 98: 281-286, 2020
6. 日本政府観光局 JNTO; https://www.jnto.go.jp/jpn/statistics/visitor_trends/index.html
7. Kitagawa K, et al. *Jpn J Infect Dis.* 71(1):8-13, 2018
8. Aldred KJ, et al. *Biochemistry.* 53(10):1565-1574, 2014
9. Mirzaii M, et al. *J Glob Antimicrob Resist.* 13:197-200, 2018
10. Hsueh P-R. *Int J Antimicrob Agents.* 40 Suppl:S1-3, 2012
11. Hooper DC, et al. *Ann N Y Acad Sci.* 1354:12-31, 2015
12. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100 ED30: 2020
13. Senchyna, et al. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 93: 250-257, 2019
14. Peleg A.Y, et al. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51: 2065-2069, 2007
15. Andorea Vila, et al. *Open Microbiol J* 5: 107-113, 2011
16. Zhang S, et al. *Antimicrob Resist Infect Control* 166: 2019
17. Liu C, et al. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 4: 2019
18. Yamasaki S, et al. *J Infect Chemother* 27: 55-61, 2021
19. N. Kakuta, et al. *Int. J. Infect. Dis.* 98: 281-286, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Yamasaki Saya, Shigemura Katsumi, Osawa Kayo, Kitagawa Koichi, Ishii Aya, Kuntaman K., Shirakawa Toshiro, Miyara Takayuki, Fujisawa Masato	4. 巻 27
2. 論文標題 Genetic analysis of ESBL-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from UTI patients in Indonesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 55～61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2020.08.007	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細谷 砂美子, 重村 克巳, 宮良 高維, 北川 孝一, 中西 典子, 木下 承皓, 大澤 佳代, Kuntaman Kuntaman, 白川 利朗, 藤澤 正人
2. 発表標題 インドネシア尿路感染症患者より検出されたCTX-M-15型ESBL産生E.coliの染色体性もしくはプラスミド性における薬剤感受性の比較
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kayo Osawa, Noriko Nakanishi, Mari Kusuki, Katsumi Shigemura, Takayuki Miyara
2. 発表標題 Acquisition of antimicrobial-resistant variants in repeated infections caused by <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020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	大澤 佳代 (Osawa Kayo) (50324942)	神戸常盤大学・保健科学部・教授 (34535)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宮良 高維 (Miyara Takayuki) (50368304)	神戸大学・医学部附属病院・特命教授 (14501)	
研究分担者	白川 利朗 (Shirakawa Toshiro) (70335446)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授 (14501)	

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