

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2022

課題番号：19KK0203

研究課題名（和文）ミャンマーで多様化するカルバペネム耐性緑膿菌に関する国際共同研究

研究課題名（英文）International collaboration study on diversity and evolution of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Myanmar

研究代表者

切替 照雄（KIRIKAE, TERUO）

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：50192563

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究を通して、多剤耐性緑膿菌をミャンマー4医療施設（ヤンゴン総合病院、新ヤンゴン総合病院、北オカラッパ教育総合病院およびサンピア総合病院）から116株収集することができた。薬剤感受性試験及びカルバペネマーゼ産生試験を実施した結果、96株がカルバペネム耐性株、77株がカルバペネマーゼ産生株であった。カルバペネム耐性遺伝子ではインド、中国で分離されるNDM型メタロ-β-ラクタマーゼ、DIM型メタロ-β-ラクタマーゼ、KPC型カルバペネマーゼ、GES型カルバペネマーゼをコードする遺伝子が同定された。病原因子解析においてはミャンマーで多く分離されたST1047株を用いてカイコ病原性を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究計画「ミャンマーの医療施設で実施可能な薬剤耐性菌検出システムに関する国際共同研究」に関する共同研究協定（MOU: Memorandum of understanding）を順天堂大学及びNHL間で締結した。分離した菌株の全ゲノム解析により薬剤耐性因子及びMLST解析を行った結果、ミャンマーで分離された株の多くはST1047であり、日本やヨーロッパの流行株はST235カルバペネム耐性緑膿菌であるが、ミャンマーでは全く異なる遺伝子背景を持つカルバペネム耐性緑膿菌が多くの医療施設から分離された。この結果は、ミャンマーで分離されるカルバペネム耐性緑膿菌が独自の進化を遂げていることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：In this study, 116 multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were collected from 4 hospitals (Yangon General Hospital, New Yangon General Hospital, North Okkalappa General & Teaching Hospital and Thingangyun General Hospital). Drug susceptibility and carbapenemase production tests were conducted, and the results showed that 96 strains were carbapenem-resistant isolates and 77 strains were carbapenemase-producing isolates. In the carbapenem resistance genes, genes encoding NDM-type metallo-β-lactamase, DIM-type metallo-β-lactamase, KPC-type carbapenemase, and GES-type carbapenemase isolated in India and China were identified. In pathogenicity analysis, silkworm pathogenicity was determined using the ST1047 strain, which was the most abundant isolate in Myanmar.

研究分野：薬剤耐性菌

キーワード：ミャンマー 多剤耐性緑膿菌 耐性因子 病原因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

地球規模で拡大している薬剤耐性菌 (AMR: Antimicrobial Resistance) 特に抗菌薬の切り札であるカルバペネム耐性菌の克服は、人類が共同で取り組むべき最重要課題である。2013年には AMR 感染症によって世界で 70 万人が死亡したと推定されるが、対策を講じない場合、20250年には世界で 1,000 万人が AMR によって死亡し、がんによる死亡者数を超えると推定されている。しかしながら、ミャンマーを含め多くの開発途上国では AMR の実態が明らかになっていない。多剤耐性菌の監視および解析のための研究拠点を構築することは、ミャンマーの感染対策および医療安全における最重要課題の一つである。これまでの国際共同研究において、ミャンマーではカルバペネム耐性に寄与するカルバペネマーゼやアミノグリコシド高度耐性に寄与する 16S rRNA メチラーゼを産生するグラム陰性菌が蔓延していることを明らかにしてきた。本研究では、ミャンマー国立衛生研究所 (NHL: National Health Laboratory) とカルバペネム耐性緑膿菌に関する国際共同研究を実施する。

#### 2. 研究の目的

ミャンマーで分離される多剤耐性緑膿菌の実態が分子疫学手法によって明らかにする。ミャンマーの医療施設 (ヤンゴン総合病院、新ヤンゴン総合病院、北オカラッパ教育総合病院およびサンピア総合病院) で分離される多様なカルバペネム耐性因子がどのような病原因子と連鎖・関連して伝播・拡大しているのかを全ゲノム配列を基盤とした比較ゲノム解析で明らかにする。さらに、分離したカルバペネム耐性緑膿菌株の病原性及びその分子基盤を明らかにする。研究代表者は NHL を拠点として、カルバペネム耐性緑膿菌の収集、薬剤感受性試験及びカルバペネマーゼ産生試験を実施する。

#### 3. 研究の方法

具体的な研究方法は(1)ミャンマーの医療施設 (ヤンゴン総合病院、新ヤンゴン総合病院、北オカラッパ教育総合病院およびサンピア総合病院)でグラム陰性菌を分離・収集する。(2)イミペネムおよびメロペネムを含む薬剤感受性試験 (ディスク法および MIC: 最小発育阻止濃度) による多剤耐性菌スクリーニングを実施する。(3)分離された多剤耐性緑膿菌を順天堂大学に移送し、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムベースの分子疫学解析を実施する。(5)カイコを用いた多剤耐性緑膿菌病原因子のスクリーニングを行う。(4)カルバペネム耐性因子と病原因子の比較ゲノム解析を行う。

#### 4. 研究成果

本研究計画「ミャンマーの医療施設で実施可能な薬剤耐性菌検出システムに関する国際共同研究」に関する共同研究協定 (MOU: Memorandum of understanding) を順天堂大学および NHL 間で締結した。また、成果有体物移転契約 (MTA: Material Transfer Agreement) を順天堂大学および NHL 間で締結し、分離菌株を順天堂大学に移送し、分子疫学解析を実施する

体制を構築した。本研究を通して、多剤耐性緑膿菌をミャンマー4 医療施設（ヤンゴン総合病院、新ヤンゴン総合病院、北オカラッパ教育総合病院およびサンピア総合病院）から 116 株収集することができた。イミペネムおよびメロペネムを含む薬剤感受性試験及びカルバペネマーゼ産生試験を実施した結果、96 株がカルバペネム耐性株（MIC 8 $\mu$ g/ml 以上）、77 株がカルバペネマーゼ産生株であった。全ゲノム解析により薬剤耐性因子および Multi locus sequencing typing (MLST) 解析を行った結果、ミャンマーで分離された株の多くは ST1047 であった。日本やヨーロッパの流行株として ST235 カルバペネム耐性緑膿菌が伝播拡大しているが、ミャンマーでは全く異なる遺伝子背景を持つカルバペネム耐性緑膿菌が多くの医療施設から分離された。この結果は、ミャンマーで分離されるカルバペネム耐性緑膿菌が独自の進化を遂げていることを示唆している。さらに、カルバペネム耐性遺伝子ではインド、中国で分離される NDM 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ、DIM 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ、KPC 型カルバペネマーゼ、GES 型カルバペネマーゼをコードする遺伝子が同定された。病原因子解析においては ST1047 株を用いてカイコ病原性を決定した。具体的には、多剤耐性緑膿菌株（NCGM2.S1, ST235）、感受性緑膿菌株（PA01, ST549）ミャンマー多剤耐性緑膿菌株（ミャンマー分離株 MyJU514, ST1047）を使い、カイコ感染実験における LD50 を算出したところ、NCGM2.S1: 60CFU、PA01: 98CFU、MyJU514: 4CFU であり、ミャンマーで分離された多剤耐性緑膿菌 ST1047 株では高いカイコ病原性が確認された。この高病原性株からゲノムを抽出し、大腸菌を用いて DNA ライブラリーを作製、コロニーをカイコに接種することで病原因子を特定した結果、Type VI Secretion System (T6SS) の 7 型エフェクターを同定した。緑膿菌 PA01 株を用いて本エフェクター因子欠損株を作製し、細胞変性効果 (CPE) を確認したところ、欠損株では CPE の低下がみられた。ベトナム、ネパールおよびミャンマーで分離されたカルバペネム耐性緑膿菌を用いて、今回同定した Type VI Secretion System (T6SS) の 7 型エフェクター分子に対する分子疫学解析を実施し、アジア地域で流行するカルバペネム耐性緑膿菌株の病原因子を解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tohya Mari, Teramoto Kanae, Watanabe Shin, Hishinuma Tomomi, Shimojima Masahito, Ogawa Miho, Tada Tatsuya, Tabe Yoko, Kirikae Teruo	4. 巻 10
2. 論文標題 Whole-Genome Sequencing-Based Re-Identification of <i>Pseudomonas putida fluorescens</i> Clinical Isolates Identified by Biochemical Bacterial Identification Systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0249121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.02491-21	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 Tohya Mari, Watanabe Shin, Teramoto Kanae, Tada Tatsuya, Kuwahara-Arai Kyoko, Mya San, Zin Khwar Nyo, Kirikae Teruo, Tin Htay Htay	4. 巻 70
2. 論文標題 <i>Pseudomonas yangonensis</i> sp. nov., isolated from wound samples of patients in a hospital in Myanmar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 3597 ~ 3605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.004181	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 該当する

1. 著者名 Tohya Mari, Watanabe Shin, Tada Tatsuya, Tin Htay Htay, Kirikae Teruo	4. 巻 70
2. 論文標題 Genome analysis-based reclassification of <i>Pseudomonas fuscovaginae</i> and <i>Pseudomonas shirazica</i> as later heterotypic synonyms of <i>Pseudomonas asplenii</i> and <i>Pseudomonas asiatica</i> , respectively	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 3547 ~ 3552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.004199	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 該当する

1. 著者名 Oshiro Satoshi, Tada Tatsuya, Watanabe Shin, Tohya Mari, Hishinuma Tomomi, Uchida Hiroki, Kuwahara-Arai Kyoko, Mya San, Zan Khin Nyein, Kirikae Teruo, Tin Htay Htay	4. 巻 5
2. 論文標題 Emergence and Spread of Carbapenem-Resistant and Aminoglycoside-Panresistant <i>Enterobacter cloacae</i> Complex Isolates Coproducing NDM-Type Metallo-β-Lactamase and 16S rRNA Methylase in Myanmar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00054-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00054-20	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 該当する

1. 著者名 Tada Tatsuya, Uchida Hiroki, Hishinuma Tomomi, Watanabe Shin, Tohya Mari, Kuwahara-Arai Kyoko, Mya San, Zan Khin Nyein, Kirikae Teruo, Tin Htay Htay	4. 巻 22
2. 論文標題 Molecular epidemiology of multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates from hospitals in Myanmar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 122 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.02.011	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 該当する

1. 著者名 Tohya Mari, Watanabe Shin, Tada Tatsuya, Tin Htay Htay, Kirikae Teruo	4. 巻 70
2. 論文標題 Genome analysis-based reclassification of <i>Pseudomonas fuscovaginae</i> and <i>Pseudomonas shirazica</i> as later heterotypic synonyms of <i>Pseudomonas asplenii</i> and <i>Pseudomonas asiatica</i> , respectively	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 3547 ~ 3552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.004199	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 -

1. 著者名 Oshiro Satoshi, Tada Tatsuya, Watanabe Shin, Tohya Mari, Hishinuma Tomomi, Uchida Hiroki, Kuwahara-Arai Kyoko, Mya San, Zan Khin Nyein, Kirikae Teruo, Tin Htay Htay	4. 巻 5
2. 論文標題 Emergence and Spread of Carbapenem-Resistant and Aminoglycoside-Panresistant Enterobacter cloacae Complex Isolates Coproducing NDM-Type Metallo-β-Lactamase and 16S rRNA Methylase in Myanmar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mSphere	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) 10.1128/mSphere.00054-20	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 -

1. 著者名 Tada Tatsuya, Uchida Hiroki, Hishinuma Tomomi, Watanabe Shin, Tohya Mari, Kuwahara-Arai Kyoko, Mya San, Zan Khin Nyein, Kirikae Teruo, Tin Htay Htay	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular epidemiology of multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates from hospitals in Myanmar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	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) 10.1016/j.jgar.2020.02.011	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 -

1. 著者名 Tohya Mari, Watanabe Shin, Teramoto Kanae, Shimojima Masahiro, Tada Tatsuya, Kuwahara-Arai Kyoko, War May Wint, Mya San, Tin Htay Htay, Kirikae Teruo	4. 巻 69
2. 論文標題 Pseudomonas juntendi sp. nov., isolated from patients in Japan and Myanmar	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 3377 ~ 3384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.003623	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 -

1. 著者名 Kananizadeh Pegah, Oshiro Satoshi, Watanabe Shin, Iwata Shu, Kuwahara-Arai Kyoko, Shimojima Masahiro, Ogawa Miho, Tada Tatsuya, Kirikae Teruo	4. 巻 20
2. 論文標題 Emergence of carbapenem-resistant and colistin-susceptible Enterobacter cloacae complex co-harboring blaIMP-1 and mcr-9 in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC 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) 10.1186/s12879-020-05021-7	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0件

〔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	多田 達哉 (TADA TATSUYA) (00624644)	順天堂大学・医学部・准教授  (32620)	
研究分担者	大城 聡 (OSHIRO SATOSHI) (80766379)	順天堂大学・医学部・助教  (32620)	

#### 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			
ミャンマー	National Health Laboratory			