

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16252

研究課題名（和文）日本の多剤耐性緑膿菌が産生するカルバペネマーゼの進化様式の解明

研究課題名（英文）Elucidating the evolution of carbapenemases produced by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Japan

研究代表者

菱沼 知美 (Hishinuma, Tomomi)

順天堂大学・大学院医学研究科・助手

研究者番号：90468570

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）：本研究により日本の医療施設でVIM型カルバペネマーゼ産生MDRPの分離率が上昇していることを明らかにし報告した。また特定の地域でプラスミド由来のVIM型MDRPが変異を繰り返し拡大していることを見出した。VIM遺伝子をタンデムに保有するMDRPを同定し、その細菌学的特性を解析した結果、VIM-24タンデムリピートが1/2MICセフェピムに対する耐性を与えることを見出し報告した。新規カルバペネマーゼとしてVIM-76およびIMP-78を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本で分離されるMDRPのほとんどが染色体由来のIMP型産生菌である中、プラスミド由来のVIM型産生菌が拡大していることを発見したことにより、VIM遺伝子の水平伝播を危惧する必要があることを報告できた。また、特定の地域で繰り返されるVIM遺伝子の変異と第4世代セファロsporin系抗菌薬cefepimeに対する耐性との関連性を示唆されたことから、感染症治療薬の選択に基礎的な知見を与えることができた。

研究成果の概要（英文）：The population of VIM-producing *P. aeruginosa* significantly increased in medical setting in Japan after 2012. The isolates carrying a plasmid harbouring blaVIM-24 types were obtained from a single hospital. The tandem duplicate of blaVIM-24 in plasmids may confer resistance against cefepime, enabling *P. aeruginosa* ST1816 strains to proliferate in hospitals in Japan. A novel metallo-β-lactamase variant, VIM-76 and IMP-78, was identified in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan.

研究分野：細菌学

キーワード：緑膿菌 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌に対して治療効果が期待されるカルバペネム、アミノグリコシドおよびフルオロキノロンの3系統の薬剤全てに耐性を獲得した多剤耐性緑膿菌(MDRP)の新興・伝播は、日本の医療安全にとって極めて深刻な問題である。我々が着目している薬剤耐性因子であるカルバペネム分解酵素(カルバペネマーゼ)は抗生剤の切り札であるカルバペネム系薬を分解し、細菌の高度カルバペネム耐性に寄与している。日本で分離されるMDRPのほとんどがカルバペネマーゼであるIMP型メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生菌であった。しかし2011年から2018年までに収集した全国のMDRP臨床分離株2,161株の分子疫学解析の結果、IMP型MBL産生のMDRPの分離率は年々減少し、GES型セリン-β-ラクタマーゼ(GES-5)が著しく増加していることが明らかとなった。さらに、ヨーロッパ諸国で広く分離されるVIM型MBL産生菌が2016年以降1.4% 2.4% 3.0%と増加していることが明らかとなった。2016年以降のVIM型MBL産生菌から2つの新規VIM型カルバペネマーゼVIM-60およびVIM-66を見出した。これらの酵素学的性状を解析した結果、これら新規バリエーションは第4世代セファロsporin系抗菌薬に対する酵素活性が著しく上昇していることが明らかとなった。申請者のこれまでの研究から、日本の医療施設で分離されるMDRPの高度耐性化はカルバペネム耐性因子の多様性と進化に関連している事が強く示唆された。多様化するカルバペネマーゼの分子進化様式を解明することは、医療現場での感染対策の基盤となる重要な研究であると考え申請した。

2. 研究の目的

本研究の目的は2019年から2021年度に日本で分離されたMDRP臨床分離株の分子疫学解析を実施し、日本におけるMDRPが産生するカルバペネマーゼの流行性およびその分子進化様式を明らかにすることである。流行性または多様性が示唆された多剤耐性緑膿菌は、過去の多剤耐性緑膿菌との比較ゲノムを行うことでこれらのダイナミクスを明らかにするとともに、ロングリードシーケンスによる比較ゲノムから多様化するカルバペネマーゼの分子進化を解明する。新規カルバペネマーゼバリエーションについて生化学的性状を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 全国の医療施設で分離されたMDRP臨床分離株の分子疫学解析

薬剤耐性プロファイル作成

2019年以降、日本の医療施設で収集されたMDRP臨床分離株において、以下の薬剤の最小発育阻止濃度を微量液体希釈法にて測定し、薬剤耐性プロファイルを作成する。試験方法およびブレイクポイントはCLSIに準拠する。

・カルバペネム系薬(イミペネム、メロペネム)・セフェム系薬(セフォタキシム、セフェピム、セフトチジム)・モノバクタム系薬(アズトレオナム)・アミノグリコシド系薬(アミカシン、アルベカシン)・キノロン系薬(シプロフロキサシン)・その他(コリスチン)

薬剤耐性因子同定

収集されたすべてのMDRP臨床分離株について、カルバペネム耐性因子(IMP-、VIM-およびGES-typeカルバペネマーゼ)、アミノグリコシド耐性因子(16S rRNAメチラーゼ、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ)、キノロン耐性因子(GyrAおよびParC)およびコリスチン耐性因子(Mcr-1)をPCRおよびシーケンスを用いて確定する。特にカルバペネマーゼについては流行性および新規バリエーションを同定する。

(2) 流行性カルバペネマーゼを産生するMDRPの比較ゲノム解析

流行性または多様性カルバペネマーゼを産生するMDRPにおいては、2003年から2018年までに収集したMDRPも合わせて次世代シーケンサ(MiSeq: Illumina社)を用いて全ゲノムを取得する。ゲノム情報を元に、ハウスキープング遺伝子によるMLST(Multilocus sequence typing)解析、SNPsベースの分子系統樹解析、薬剤耐性因子の周辺構造解析を行い、詳細な流行性や動向およびその進化系統を明らかにする。さらに新規バリエーション株については、2018年に導入したロングリードの次世代シーケンサ(MinION: Oxford Nanopore社)を用いて、ゲノミックアイランドの比較ゲノムを実施し、薬剤耐性因子インテグレート機構を明らかにすることでカルバペネマーゼの分子進化様式を解明する。

(3) 新規カルバペネマーゼの生化学的性状解析

新規カルバペネマーゼバリエーションにおいては、その遺伝子をクローニングし大腸菌で発現させ、主要薬剤のMICを測定し、新規カルバペネマーゼ遺伝子がもつ薬剤耐性を明らかにする。さらに、リコンビナントタンパク質を精製する。分光光度計を用いて同薬剤に対する酵素活性を解析し、カルバペネム分解活性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) VIM型カルバペネマーゼ産生 MDRP の分子疫学解析

2019年から2022年まで日本の医療施設で分離された MDRP 臨床分離株 323 株の分子疫学解析を行った結果、IMP型カルバペネマーゼ産生 MDRP はさらに減少し、VIM型カルバペネマーゼ産生 MDRP の分離率が上昇していることがわかった。そこで、2012年以降に日本の医療施設で分離された VIM型産生 MDRP 27 株について分子疫学解析を実施したところ、VIM-1 (7 株)、VIM-2 (7 株)、VIM-24 (4 株)、VIM-60 (5 株) および VIM-66 (4 株) を同定した。VIM-24、VIM-60 および VIM-66 の株は、全て愛媛県の医療施設で分離されていた (図 1)。また VIM-24 と比較して、VIM-60 は 1 つのアミノ酸置換 (His252Arg) があり、VIM-66 はさらにもう 1 つのアミノ酸置換 (Ser141Leu, His252Arg) があったことから、VIM 遺伝子が特定の地域において変異を繰り返し拡大していることが示唆された。

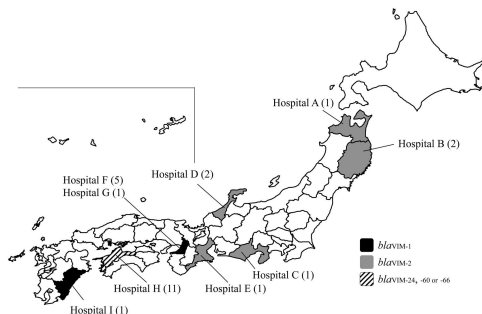


図1.VIM型MDRPが分離された都道府県

MLST 解析および分子系統解析の結果、VIM型産生 MDRP は ST1816、ST179、ST235 および ST233 に属し、大きく 2 つの Clade に分かれた (図 2)。Clade A は ST1816 に属した株、Clade B は ST235 に属した株だった。ST1816 には、VIM-24、VIM-60 および VIM-66 の株が属しており、これらの株は VIM 遺伝子を約 60kbp の IncP-9 に属するプラスミドに保有していた。プラスミドの比較ゲノム解析の結果、プラスミド構造は類似していた。また、13 株中 4 株 (NCGM3596、NCGM3741、NCGM3822 および NCGM3814_2) が保有する VIM-24 遺伝子はプラスミド上にタンデム構造を形成していることを見出した。これら 4 株のプラスミドはフィルター接合によって *P. aeruginosa* PAO1 へ伝達された ($1.8 \times 10^{-7} \sim 7.0 \times 10^{-6}$)。一方、液体接合では、4 つのプラスミド中、2 つのプラスミド (pNCGM3741 および pNCGM3822) が PAO1 へ接合した (8.6×10^{-6} および 2.6×10^{-6})。プラスミドが接合伝達された PAO1 は cefepime, ceftazidime, imipenem および meropenem に対して耐性を獲得した。以上のことから特定の地域でプラスミドの伝播により VIM型産生 MDRP が拡大していることが示唆された。

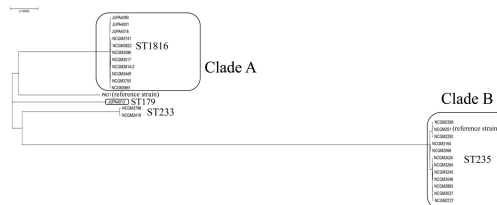


図2.VIM型MDRPの分子系統樹

(2) タンデムリピート VIM-24 を保有する VIM 型産生 MDRP の細菌学的解析

シャトルベクター-pUCP19 に 1 コピー VIM-24 およびタンデムリピート VIM-24 をクローニングし、それぞれを PAO1 へ導入した形質転換体を作成した。どちらの PAO1 形質転換体も、それぞれ cefepime, ceftazidime, imipenem および meropenem に対して耐性を獲得したが、両形質転換体において MIC に差はなかった。しかし、1/2MIC 濃度の cefepime と meropenem 存在下での growth kinetics assay を行なった結果、meropenem 存在下では、1 コピーの形質転換体とタンデムリピートの形質転換体は同様に増殖開始が遅れたが、cefepime 存在下では、タンデムリピートのほうが 1 コピーよりも早く増殖が開始した (図 3)。cefepime 存在下での time-killing assay を実施したところ、薬剤なしと比較して、1 コピーの形質転換体は増殖が抑制されたが、タンデムリピートの形質転換体はほとんど影響を受けなかった。ウェスタンブロッティングによりタンデムリピートの形質転換体の VIM-24 の発現は 1 コピーと比較して 2.6 倍高かった。以上の結果から、VIM-24 タンデムリピートが 1/2MIC セフェピムに対する耐性を与えることを見出した。

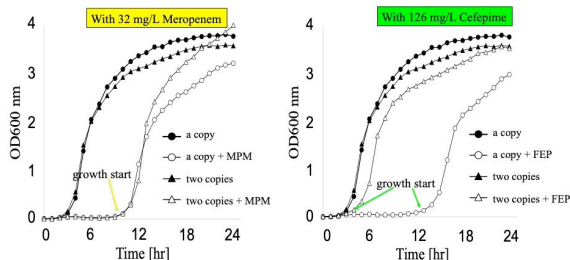


図3.Growth kinetics assay

(3) 新規カルバペネマーゼの生化学性状解析

VIM-60 および VIM-66 に続いて、新規バリエーション VIM-76 (2 株) を同定した。VIM-76 は、VIM-60 と VIM-66 と同様に、愛媛県で分離された。VIM-60 と比較して、VIM-76 は 1 つのアミノ酸置換 (Val148Leu) があった。VIM-76 を発現させた大腸菌は、cefepime, ceftazidime, cefepime および ceftazidime に対する MICs が有意に高かった。さらに特定の地域でメロペネムに高度耐性を示す IMP-78 産生株が新興していることを見出した。したがって、今後新たに流行性カルバペネマーゼが変化する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hishinuma Tomomi, Tada Tatsuya, Tohya Mari, Shintani Masaki, Suzuki Masato, Shimojima Masahiro, Kirikae Teruo	4. 巻 29
2. 論文標題 Plasmids harboring a tandem duplicate of blaVIM-24 in carbapenem-resistant ST1816 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 10 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/mdr.2022.0168	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 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 -
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 Ono Emi, Tohya Mari, Tada Tatsuya, Hishinuma Tomomi, Watanabe Shin, Kuwahara-Arai Kyoko, Kirikae Teruo	4. 巻 72
2. 論文標題 Emergence of carbapenem-resistant <i>Pseudomonas alcaligenes</i> and <i>Pseudomonas paracaligenes</i> clinical isolates with plasmids harbouring blaIMP-1 in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	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) 10.1099/jmm.0.001684	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 Hishinuma Tomomi, Uchida Hiroki, Tohya Mari, Shimojima Masahiro, Tada Tatsuya, Kirikae Teruo	4. 巻 23
2. 論文標題 Emergence and spread of VIM-type metallo-β-lactamase-producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinical isolates in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 265 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.09.010	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菱沼知美、多田達哉、遠矢真理、新谷政己、鈴木仁人、小川美保、霜島正浩、切替照雄
2. 発表標題 カルバペネム耐性緑膿菌臨床分離株で見出されたVIM-24メタロ βラクタマーゼ遺伝子反復配列
3. 学会等名 第52回薬剤耐性菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菱沼知美、多田達哉、遠矢真理、大城聡、小川美保、霜島正浩、切替照雄
2. 発表標題 日本の医療施設で分離されたST1816に属するVIM型メタロβラクタマーゼ産生緑膿菌のプラスミド解析
3. 学会等名 第50回薬剤耐性菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菱沼知美、多田達哉、遠矢真理、霜島正浩、切替照雄
2. 発表標題 日本の医療施設で分離されたVIM型カルバペネマーゼ産生MDRPの分子疫学解析
3. 学会等名 第49回薬剤耐性菌研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------