

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591489

研究課題名(和文) 多剤耐性菌における分子疫学マーカーとしてのインテグロンの解析と実用化

研究課題名(英文) Integrons as epidemiological molecular markers for identifying and surveying multi-drug resistance genes in Gram-negative bacilli

研究代表者

趙 維華 (Zhao, Wei-Hua)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：90327916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：複数の病院から80株のMBL産生グラム陰性細菌の臨床分離株を収集し、DNAを抽出した。インテグロン-1をターゲットとする一対のプライマーを設計し、挟む遺伝子をPCR法で増幅した。PCR産物のDNA配列解析を行い、耐性遺伝子の種類とその並び方を解明した。数種類のMBL耐性遺伝子と他の耐性遺伝子の共存が検出された。本研究で、インテグロンを多剤耐性菌の同定における分子疫学のマーカーとして樹立させる目的を達成し、耐性遺伝子の病院内定着と伝播をサーベイランスするために、この分子疫学的手法の有効性を確認した。研究成果を専門誌に発表した。更なる努力によって、一層の臨床的応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We collected 80 clinical isolates of metallo-β-lactamases (MBL)-producing Gram-negative bacilli from several hospitals and extracted their DNA. A pair of primers was designed to target the 5' and 3' conserved segments of class 1 integron and used in PCR amplification of the potential resistance determinants harbored by the bacteria. The DNA sequencing data of PCR products revealed that 5 types of metallo-β-lactamases including bla_{IMP}-1, -7, -10, -11 and bla_{VIM}-2 coexisted with resistance determinants encoding aminoglycoside-modifying enzymes in the class 1 integrons. The diversity of gene cassette arrangement in a class 1 integron implicates different origins and acquisition events of the resistance determinants. The results indicate that the experimental design is reasonable and integron 1 can be used as an epidemiological molecular marker for efficiently identifying and surveilling MBL-producers. The related papers are published in medical journals.

研究分野：細菌学・免疫学

キーワード：グラム陰性桿菌 薬剤耐性遺伝子 インテグロン β-ラクタマーゼ メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL)
PCR分析 DNAシーケンス解析

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性大腸菌、緑膿菌、肺炎桿菌、アシネトバクター、結核菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、バンコマイシン耐性腸球菌等の多剤耐性病原菌が次々と出現し、臨床の場に極めて深刻な影響を与えている。薬剤耐性菌による逆襲に対抗するためには、新しい抗菌薬の開発が必須であるが、抗菌薬が登場してから耐性菌が報告されるまでの期間は約4年と短く、悪循環の連続になっている。新規抗菌薬の開発が容易ではない中、多剤耐性菌予防・治療の新しいアプローチが待たれているのが現状である。

現実的対策として、耐性菌を増やさないように抗菌薬を適切に使用すると共に、既に存在する耐性菌の拡大防止策が挙げられる。特に、耐性菌の効率的検出とサーベイランス、保菌者と感染患者の早期発見、院内感染症の起源と感染経路の究明等といった疫学的対応が極めて重要である。しかし、通常の薬剤感受性試験等の臨床検査での対応には限界がある。さらに、複数の耐性機序を集積した多剤耐性菌においては、複雑な追加試験を実施しなければその存在を把握できない。病原菌疫学的解析法の一つであるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法にも限界がある。ゲノム構成が非常に安定な菌種の場合には、どの事例から分離される菌も PFGE パターンが高い類似性を示すため、疫学的解析にはあまり意義を与えない。また、PFGE 法では伝達性多剤耐性遺伝子の菌種内、菌種間および菌属間の伝播と、その動向を把握することは不可能である。さらに、PFGE 法の操作は簡易とは言えない。

そのため、耐性菌の分子疫学研究において、通常の薬剤感受性試験と PFGE 法に加え、より解析能と精度の高い DNA 配列解析に基づく分子疫学的手法の併用が不可欠である。そこで本研究計画は、インテグロン (integron)

を新たな分子疫学のマーカーとして利用する分子疫学法の樹立を目指す。

インテグロンとは、細菌が持つ外来の遺伝子を取り込んでそれを強力に発現させる遺伝子構造であり、トランスポゾン、プラスミドと染色体 DNA 上を頻繁に転位する。その故、インテグロンに獲得された耐性遺伝子は容易に菌間で伝達される。通常、インテグロンは以下の基本構造を持つ： インテグラーゼをコードする遺伝子 (*intI*)； 組み込んだ遺伝子カセットとそれを発現させる強力なプロモーター (Pc)； 組み換え部位 *aatI* と *aatC*。インテグラーゼは *aatI* と *aatC* 部位を認識して外来遺伝子を組み込み、複数の遺伝子カセットを集積させる。インテグラーゼ遺伝子の多様性によって、インテグロンは 8 つのクラスに分類される。その中で、耐性遺伝子と関連するのは主にインテグロン-1 と-2 である。

インテグラーゼ-1 をコードする遺伝子 (*intI1*) は 5'末端の保存セグメント (conserved segment, 5'-CS) にあり、第四級アンモニウム塩耐性遺伝子 (*qacEΔ1*) とサルファ剤耐性遺伝子 (*sulI*) は 3'-CS にある。注目されている耐性遺伝子はこの保存性の高い 5'-CS と 3'-CS 領域の間に挟っている。β-ラクタム剤耐性遺伝子 (*bla*)、アミノ配糖体耐性遺伝子 (*aac*, *aad*)、トリメトプリム葉酸代謝拮抗剤耐性遺伝子 (*dfr*) 等を含む数千種類の遺伝子カセットが同定されている。さらに多剤耐性化の原因として、複数の耐性遺伝子カセットを一つのインテグロン中に保持できることが挙げられる。

インテグロン-1 の 5'-CS と 3'-CS の配列に相補的な一対のプライマーを設計すると、そのプライマーが挟む全ての遺伝子を PCR 法で一気に増幅することができる。その PCR 産物の DNA 配列解析を行うことによって、遺伝子の種類およびその並び方を解明できる。即ち、インテグロン-1 を分子疫学のマーカーと

して利用し、耐性遺伝子の検出、新たな耐性遺伝子の発見、院内感染の起源と感染経路の究明、院内感染症の診断、および治療薬の選択等で実用できると考えられる。

2. 研究の目的

インテグロンに関する研究は国内外で多く行われているが、それを分子疫学のマーカーとして利用する報告はない。本研究計画は、インテグロンを多剤耐性菌の同定における新たな分子疫学のマーカーとして樹立させるのを目的とする。そして、多剤耐性菌と耐性遺伝子の検出、新たな耐性遺伝子の発見、感染経路の究明、耐性菌動向の予測、治療薬の選択および院内感染対策の制定等でこの方法の臨床実用化を図る。

3. 研究の方法

- 1). 供試菌株とその臨床資料の収集：平成24年から、複数の病院から分離された耐性グラム陰性菌とその詳細資料を収集した。
- 2). 薬剤感受性試験：微量液体希釈法を用いて各菌株に対する種々の抗生物質の最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。特に、臨床でよく使用されているβ-ラクタム系(ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系、モノバクタム系)、アミノ配糖体系、ニューキノロン系の抗生物質を中心に薬剤感受性パターンを確認した。
- 3). β-ラクタマーゼ産生菌のスクリーニングとメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生能の確認：特異的な抑制剤(メルカプト酢酸ナトリウム)を利用したディスク拡散法によって、MBL産生菌をスクリーニングした。
- 4). DNA抽出：QIAGEN社のDNA抽出キットを用いて、全ての供試菌からDNAを抽出した。
- 5). PFGE解析：同種の菌株間における薬剤感受性パターンとMICが類似している場合、PFGE解析法を用いて菌株間のDNA構成の

差を検出した。制限酵素 SpeI を用いて抽出したDNAを切断後、Bio-Rad社の電気泳動装置(CHEF-DR System)にかけて分離し、泳動後のパターンを比較した。PFGE解析によって、同じ耐性株による院内感染者であるか否かを確定した。

6). 耐性遺伝子の伝達：*E. coli* HB101と*E. coli* JM109をレシピエントとして用い、接合と形質転換による耐性遺伝子の伝達性を検証した。

7). PCRによるインテグロンの増幅：インテグロン-1に共通する遺伝子配列、即ち、5'-CSにあるインテグラーゼ-1遺伝子(*intI1*)と3'-CSにある*qacEΔ1*に相補的な一対のプライマーを設計し、そのプライマーが挟む遺伝子をPCR法で増幅した。

8). PCR産物のDNA配列解析：PCR産物の大きさをまず電気泳動で判定し、目的のDNA断片を抽出キットで精製し、DNA配列解析を行った。

9). 耐性遺伝子及びその並び方の解明：専用ソフトウェア(DNASIS Pro)を用いてシークエンスデータを解析し、データベース(GenBank)との照合によって耐性遺伝子の種類とその並び方を解明した。

4. 研究成果と今後の展望

獲得型のメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)には、IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, SIM, DIM, KHM, TMB, FIM, AIMの11タイプが同定されている。この内、IMP, VIM, GIM, SIM, DIM, TMBをコードする耐性遺伝子はインテグロン-1に取り込まれており、強力的に発現される。本研究で、我々はインテグロン-1(integron-1)をターゲットとして、MBL耐性遺伝子の検出を行った。

複数の病院から80株のMBL産生グラム陰性細菌(*Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*,

Pseudomonas aeruginosa) の臨床分離株を収集し、DNA を抽出した。インテグロン-1 の 5'-CS と 3'-CS の配列に相補的な一対のプライマーを用いて、そのプライマーが挟む全ての遺伝子を PCR 法で増幅した。この内、76 株から、2300 bp~ 4000 bp DNA 断片を得られた。即ち、95%以上の MBL 産生グラム陰性細菌株がインテグロン-1 を保有していると分かった。さらに、PCR 産物の DNA 配列解析を行い、そのシーケンスデータと NCBI の核酸データベースを照合して、耐性遺伝子の種類とその並び方を解明した。その結果、76 の菌株から、MBL をコードする *bla*_{IMP-1}、*bla*_{IMP-7}、*bla*_{IMP-10}、*bla*_{IMP-11}、*bla*_{vim-2} 遺伝子がインテグロン-1 内に確認された。その内、腸内細菌科の菌にも *bla*_{IMP-10} 耐性遺伝子、大腸菌や肺炎桿菌にも *bla*_{IMP-11} 耐性遺伝子が存在していることを初めて確認した。β-ラクタマーゼのほかに、アミノグリコシドを修正する酵素をコードする耐性遺伝子である *aac*(6')*Iae*、*aac*(6')*II*、*aacA7*、*aacC4*、*aadA1*、*aadA2*、*aadA6* もインテグロン-1 内に検出された。即ち、MBL と他の数種類の耐性遺伝子が共存していることが分かった。特に、*intI1-bla*_{IMP-1}-*aac*(6')*IIC-qacEA1* の構造は 39% (30/76) の MBL 産生グラム陰性細菌株から確認された。この構造を持つ菌株 (*C. freundii*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens*) は異なる病院・異なる時期から分離された。即ち、病院の環境内でのこの *intI1-bla*_{IMP-1}-*aac*(6')*IIC-qacEA1* の定着を示している。以上の結果から、インテグロン-1 をターゲットとするこの分子疫学的手法は、耐性遺伝子の病院内の定着と伝播をサーベイランスすることに貢献できると考えられる。これらの研究成果をまとめた原著論文と総説を *Critical Reviews in Microbiology*、*Future Microbiology*、*Journal of Medical Microbiology* 等の雑誌に発表した。また、データの整理と 2 編の原著論文の執筆を継続している。

臨床現場における多剤耐性菌の同定にお

いて、日常の薬剤感受性試験に加え、分子疫学的手法を用いた遺伝子レベルでの同定とサーベイランスを必要とする時代になりつつある。本研究は、インテグロンを多剤耐性菌の同定における分子疫学のマーカーとして樹立させる目的を達成し、耐性遺伝子の病院内定着と伝播をサーベイランスできるこの分子疫学的手法の有効性を確認した。今後、臨床検査室の日常の薬剤感受性試験と歩調を合わせて、実践的にこの分子疫学手法の有用性を確認する必要がある。数百株の耐性菌の耐性遺伝子情報とそれらの菌に関連する臨床資料を分析し、診療科別、病院別、および菌種別の基礎データベースを構築する必要がある。それによって、耐性菌の効率的検出、院内感染症の起源と感染経路の究明、多剤耐性菌の動向とその機序解明、保菌者と感染患者の迅速且つ正確な診断、感染拡大防止策の制定、および治療薬の選定等への展開が大いに期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(本研究期間内 計 10 件)

1. Wei-Hua Zhao & Zhi-Qing Hu. Acquired metallo-β-lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. **Future Microbiol.** 10: 873-887, 2015.
2. Zhi-Qing Hu & Wei-Hua Zhao. IL-33/ST2 axis is specifically required for development of adipose tissue-resident regulatory T cells. **Cell. Mol. Immunol.** 12(5): 2015 in press.
3. Wei-Hua Zhao & Zhi-Qing Hu. Integrons: epidemiological molecular markers for identifying and surveying metallo-β-lactamase genes in Gram-negative bacilli. **Future Microbiol.** 9: 5-8, 2014.
4. Wei-Hua Zhao & Zhi-Qing Hu. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum

- β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Crit. Rev. Microbiol.** 39: 79-101, 2013.
5. Zhi-Qing Hu & Wei-Hua Zhao. Type 1 interferon-associated necroptosis: a novel mechanism for *Salmonella enterica* Typhimurium to induce macrophage death. **Cell. Mol. Immunol.** 10: 10-12, 2013.
 6. Zhi-Qing Hu & Wei-Hua Zhao. Critical role of PD-1/PD-L1 pathway in generation and function of follicular regulatory T cells. **Cell. Mol. Immunol.** 10: 286-288, 2013.
 7. Wei-Hua Zhao & Zhi-Qing Hu. *Acinetobacter*: A potential reservoir and dispenser for β -lactamases. **Crit. Rev. Microbiol.** 38: 30-51, 2012.
 8. Zhi-Qing Hu & Wei-Hua Zhao. Novel insights into the molecular mechanisms of α -fetoprotein expression and malignant phenotypes of hepatocellular carcinoma. **Cell. Mol. Immunol.** 9: 7-8, 2012.
 9. Wei-Hua Zhao & Zhi-Qing Hu. Up-regulation of IL-33 expression in various types of murine cells by IL-3 and IL-4. **Cytokine** 58: 267-273, 2012.
 10. Wei-Hua Zhao, Gelin Chen, Ribu Ito, Satoshi Kimura & Zhi-Qing Hu. Identification of a plasmid-borne *bla*_{IMP-11} gene in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **J. Med. Microbiol.** 61: 246-251, 2012.

(学会発表)(本研究期間内 計 4 件)

1. Wei-Hua Zhao & Zhi-Qing Hu. Acquired metallo- β -lactamases and their genetic supports in clinical isolates of Gram-negative bacilli. **15th APCCMI (Asia Pacific Congress on Clinical Microbiology & Infection)**. November 26~29, 2014, Kuala Lumpur, Malaysia.
2. Wei-Hua Zhao & Zhi-Qing Hu. Spread of integron-associated multidrug resistance in bacilli. 第 87 回日本細菌学会総会 (千葉

2014 年 3 月)

3. Wei-Hua Zhao & Zhi-Qing Hu. Colonization of *intI1-bla*_{IMP-1}-*aac(6')**IIC-qacEA1* carried by a conjugative plasmid in Enterobacteriaceae. **13th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection**. October 25~28, 2012, Beijing, China.
4. Zhi-Qing Hu & Wei-Hua Zhao. Up-regulation by IL-4, IL-13, FGF-b and down-regulation by TGF- β of IL-33 expression in vascular endothelial cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (神戸 2012 年 12 月)

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

趙 維華 (Wei-Hua Zhao)

昭和大学医学部 講師

研究者番号: 90327916

(2) 研究分担者

胡 志青 (Zhi-Qing Hu)

昭和大学医学部 准教授

研究者番号: 60245826

(3) 連携研究者