

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791020

研究課題名(和文) ベータラクタマーゼ阻害剤耐性グラム陰性桿菌の耐性機構の解明と分子疫学解析

研究課題名(英文) Analysis of resistance mechanisms and epidemiology of beta-lactamase inhibitor-resistant gram-negative bacillus

研究代表者

木村 幸司 (Kimura, Kouji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50425675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、院内感染疑い事例のベータラクタマーゼ阻害剤耐性の *Klebsiella oxytoca* を解析した。これらの株群は Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析により、近縁の遺伝的背景を持つ株群であることを明らかにした。また、等電点電気泳動法、クローニング実験等により、ベータラクタマーゼ阻害剤耐性の *Klebsiella oxytoca* のベータラクタマーゼ阻害剤耐性機構の主たる要因は、ベータラクタマーゼ RbiA の単独産生であると結論付けた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed clinical isolates of beta-lactamase inhibitor-resistant *Klebsiella oxytoca*, which suspected to spread nosocomially. The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis showed that these clinical isolates have identical genetical background. The electrophoresis of isoelectric point suggested that the clinical isolate produced one kind of beta-lactamase. Moreover, we revealed that these clinical isolates produced a beta-lactamase RbiA, which we reported previously. We generated the *E. coli* producing a beta-lactamase RbiA by transformation. The *E. coli* showed beta-lactamase inhibitor-resistance, suggesting that producing a beta-lactamase RbiA is the major cause of beta-lactamase inhibitor-resistance in the clinical isolates of beta-lactamase inhibitor-resistant *Klebsiella oxytoca*.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、感染症内科学

キーワード： *Klebsiella oxytoca* ベータラクタマーゼ阻害剤耐性 ベータラクタマーゼ RbiA

## 1. 研究開始当初の背景

新たな抗菌薬が、医療現場に導入されると、淘汰される細菌もあるが、選択圧が変化するため、逆に増殖や拡散が促進される細菌が出現することが広く知られている。また、拡散を始める細菌の種類は、新たな抗菌薬導入前の細菌群の種類、分布により異なってくる事が予想されるため、諸外国のような、他の地域の知見がそのまま日本に当てはまるとは限らず、日本でもその動向を監視する必要がある。

TAZ/PIPC は、 $\beta$ -lactamase 阻害剤である tazobactam と広域半合成ペニシリン系薬の piperacillin を配合した注射用抗菌薬であり、2001 年に商品名タゾシン、用量配合比率を変えて 2008 年に商品名ゾシンとして日本で承認されている。先行して世界で広く使われて来たが、日本でも使用量が増加傾向にあると考えられている。特に日本では、CTX-M 型の  $\beta$ -lactamase などを産生する ESBL 産生グラム陰性桿菌が医療現場で問題となっており、その感染症の治療や緑膿菌感染症の治療の選択肢の一つとして TAZ/PIPC が広く使用されている。

Piperacillin を含む  $\beta$ -lactam 系薬に対する耐性機構は、大きく分けて二つ考えられる。一つは、 $\beta$ -lactam 系薬を分解する  $\beta$ -lactamase の産生、もう一つは  $\beta$ -lactam 系薬の標的である Penicillin-binding protein (PBP) 遺伝子群の変異の獲得である。グラム陰性桿菌の  $\beta$ -lactam 系薬耐性機構については、 $\beta$ -lactamase 産生の場合がきわめて多い。

TAZ/PIPC の使用後に増加が予想される TAZ/PIPC 耐性グラム陰性桿菌は、現在のところ、少なくとも三つある。一つは TAZ/PIPC に対して高い Minimum inhibitory concentration (MIC、最小発育阻止濃度) 値を示す KPC-型 carbapenemase 産生グラム陰性桿菌、もう一つは申請者が報告した  $\beta$ -lactamase 阻害剤が効きづらいタイプの  $\beta$ -lactamase である RbiA の遺伝子を染色体上にもつ *Klebsiella oxytoca* である。もう一つは、IRT と呼ばれる一部の TEM type の  $\beta$ -lactamase を産生するグラム陰性桿菌である。

米国では、日本より先行し、TAZ/PIPC が広汎に使用されており、それが KPC-型 carbapenemase 産生グラム陰性桿菌が米国で多い一因であると考えられる研究者もいる。また、マウスの感染実験では、TAZ/PIPC の投与によって、KPC-型 carbapenemase 産生グラム陰性桿菌の定着能が上昇するとの論文 (Perez F. et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2011, 55(6)p2585-9) も最近報告されており、TAZ/PIPC の使用により、KPC-型 carbapenemase 産生グラム陰性桿菌のさらなる増加に注意を払う必要がある。現在のところ、日本では KPC-型 carbapenemase 産生グラム陰性桿菌の分離は、きわめて稀であるが、今後、国内でも KPC-型

carbapenemase 産生グラム陰性桿菌が増加する可能性が十分にあり、積極的な監視が必要である。

日本では、1990 年代に、tazobactam を含む  $\beta$ -lactamase 阻害剤が効きづらいタイプの  $\beta$ -lactamase (RbiA) を染色体上に一部の *K. oxytoca* が有することを申請者が明らかにしている。その後の解析により、一部の *K. oxytoca* は、プロモーター領域に変異を獲得し、プロモーター活性が高まり、RbiA type の  $\beta$ -lactamase を過剰産生することで、 $\beta$ -lactamase 阻害剤に対して高い MIC 値を示すことが明らかになっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、TAZ/PIPC 耐性グラム陰性桿菌の一例として、TAZ/PIPC の使用量が多い愛知県内のある病院でアウトブレイクした TAZ/PIPC 耐性 *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) の薬剤耐性機構解析、分子疫学的解析を行い、どのような耐性機構、遺伝子型の TAZ/PIPC 耐性 *K. oxytoca* がアウトブレイクを起こしたのかを明らかにする。その成果を論文、学会等で発表することにより、TAZ/PIPC 使用時に TAZ/PIPC 耐性 *K. oxytoca* が拡散する恐れのあることを例示し、医療現場に注意喚起する。

## 3. 研究の方法

アウトブレイクを起こした TAZ/PIPC 耐性 *K. oxytoca* は、申請者が発見した染色体性  $\beta$ -lactamase RbiA を全株が有していることを既に明らかにしたが、さらに Pulsed-fields gel electrophoresis (PFGE) 解析、Multi-locus sequence type (MLST) 解析などを行うとともに、 $\beta$ -lactamase 遺伝子のクローニングを行い、 $\beta$ -lactamase RbiA で TAZ/PIPC 高度耐性を説明できるかを検討する。

## 4. 研究成果

一医療施設でアウトブレイクした TAZ/PIPC 耐性 *K. oxytoca* について、以下の実験を行った。

(1) TAZ/PIPC 耐性遺伝子のクローニング: アウトブレイクを起こした TAZ/PIPC 耐性 *K. oxytoca* は、申請者が発見した  $\beta$ -lactamase RbiA を全株が有していることが既に明らかになっていた。 $\beta$ -lactamase RbiA をクローニングした大腸菌を用いて、MIC 測定を行い、 $\beta$ -lactamase RbiA により TAZ/PIPC 耐性を獲得することを明らかにし、 $\beta$ -lactamase RbiA が TAZ/PIPC 耐性遺伝子であることを確認した。

(2) Pulsed-fields gel electrophoresis (PFGE) 解析: アウトブレイクを起こした TAZ/PIPC 耐性 *K. oxytoca* は、申請者が発見した  $\beta$ -lactamase RbiA を全株が有しており、RbiA の核酸配列は、silent mutation を含め 100% 一致していることを既に明らかになっ

ていた。さらに、本研究室で*K. oxytoca*のPFGE解析を立ち上げた。それにより、アウトブレイクを起こしたTAZ/PIPC耐性*K. oxytoca*は遺伝的に近縁な菌株群であることが明らかになった。

(3) 等電点電気泳動：近年、一つの菌株が複数のβ-lactamaseを産生することが多く報告されている。今回、アウトブレイクを起こしたTAZ/PIPC耐性*K. oxytoca*について、等電点電気泳動を行い、多くのβ-lactamaseの基質である発色物質ニトロセフィンを用い、β-lactamaseを可視化した。今回、解析したアウトブレイクを起こしたTAZ/PIPC耐性*K. oxytoca*では、一本のバンドのみ認められ、しかもβ-lactamase RbiAと考えると矛盾しない等電点であった。このことから今回、解析したアウトブレイクを起こしたTAZ/PIPC耐性*K. oxytoca*は、β-lactamase RbiAの単独産生株であると考えられた。

(4) Multi-locus sequence typing (MLST)解析：アウトブレイクを起こしたTAZ/PIPC耐性*K. oxytoca*は、*K. oxytoca*の中でも特定の菌株群である可能性があり、世界中の他施設と比較できるようにすることは、有益な情報となる。近年まで*K. oxytoca*のMLST解析法は開発されておらず、近縁種である*K. pneumoniae*のMLST法を用いて、アウトブレイクを起こしたTAZ/PIPC耐性*K. oxytoca*についてMLST解析を行った。その結果、7つのハウスキーピング遺伝子のうち、いくつかはPCR法で増幅できなかったが、増幅できたものに関しては、今回、解析したアウトブレイクTAZ/PIPC耐性*K. oxytoca*の全ての株の配列が一致した。このことは、これらの菌株群が共通の遺伝的背景を持つ菌株群であると考えて矛盾しない結果である。

## 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](計 8件)

K. Kimura\*, H. Yanagisawa, J. Wachino, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013) \*corresponding author

“Rapid and reliable loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Streptococcus agalactiae*”

**Japanese Journal of Infectious Diseases** 66:p546-548. (IF 1.507)(査読あり)

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/66/6/66\\_546/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/66/6/66_546/_article)

K. Kimura\*, J. Wachino, H. Kurokawa, M. Matsui, S. Suzuki, K. Yamane, N. Nagano, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013) \*corresponding author

“High cephalosporin resistance due to amino acid substitutions in PBP1A and PBP2X in a clinical isolate of group B streptococcus”

**The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**

68(7): p1533-1536. (IF 5.338) (査読あり)

doi: 10.1093/jac/dkt060.

K. Kimura\*, Y. Nishiyama, S. Shimizu, J. Wachino, M. Matsui, S. Suzuki, K. Yamane, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013) \*corresponding author

“Screening for Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility (PRGBS) in Clinical Isolates Obtained between 1977 and 2005”

**Japanese Journal of Infectious Diseases** 66(3): p222-225. (IF 1.507) (査読あり)

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/66/3/66\\_222/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/66/3/66_222/_article)

K. Kimura\*, K. Matsubara, G. Yamamoto, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013) \*corresponding author

“Active Screening of Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility and Altered Serotype Distribution, Isolated from Pregnant Women in Kobe, Japan”

**Japanese Journal of Infectious Diseases** 66(2): p158-160. (IF 1.507) (査読あり)

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/66/2/66\\_158/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/66/2/66_158/_article)

K. Kimura\*, N. Nagano, Y. Nagano, J. Wachino, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013) \*corresponding author

“Ability of the VITEK® 2 System to Detect Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility (PRGBS)”

**The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 68(6): p1442-1444. (IF 5.338) (査読あり)

doi: 10.1093/jac/dkt008.

K. Kimura\*, N. Nagano, Y. Nagano, S. Suzuki, J. Wachino, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013) \*corresponding author

“High Frequency of Fluoroquinolone- and Macrolide-resistant Streptococci among Clinically Isolated Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility”

**The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 68(3):p539-542 (IF 5.338) (査読あり)

doi: 10.1093/jac/dks423.

N. Nagano, Y. Nagano, M. Toyama, K. Kimura, T. Tamura, K. Shibayama, Y. Arakawa (2012)

“Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1”

**The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 67(4):p849-856 (IF 5.338) (査読あり)

doi: 10.1093/jac/dkr546.

岩田あや、松原康策、仁紙宏之、内田佳子、木村幸司、荒川宜親、青柳祐子、高橋信二 (2012)

“超遅発型 B 群溶血性レンサ球菌感染症-2 症例報告”

感染症学雑誌 第 86 巻第 5 号 p604-607. (査読あり)

〔学会発表〕(計 20 件)

山田景子、**木村幸司**、和知野純一、荒川宜親(2014)

“黄色ブドウ球菌のアルベカシン耐性”

第87回日本細菌学会総会(ポスター発表)

東京 タワーホール船堀 3月26日-28日

坂野弘嗣、**木村幸司**、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親(2014)

“非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)の解析”

第87回日本細菌学会総会(ポスター発表)

東京 タワーホール船堀 3月26日-28日

**木村幸司**、和知野純一、松井真理、鈴木里和、山根一和、柴山恵吾、荒川宜親(2014)

“B群連鎖球菌はPBP2XとPBP1Aのアミノ酸変異獲得でセファロスポリン高度耐性になっている”

第87回日本細菌学会総会(ポスター発表)

東京 タワーホール船堀 3月26日-28日

坂野弘嗣、**木村幸司**、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親(2014)

“非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)の解析”

第25回日本臨床微生物学会総会(口頭発表)

名古屋 名古屋国際会議場 2月1日-2日

坂野弘嗣、**木村幸司**、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親(2013)

“非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)の解析”

第50回日本細菌学会中部支部総会(口頭発表) 蒲郡 ホテル竹島 10月18日-19日

北仲博光、和知野純一、山田景子、**木村幸司**、荒川宜親(2013)

“カルバペネム及び広域セフェム薬耐性腸内細菌科菌種におけるβ-ラクタマーゼの鑑別”

第50回日本細菌学会中部支部総会(口頭発表) 蒲郡 ホテル竹島 10月18日-19日

坂野弘嗣、**木村幸司**、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親(2013)

“非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)の解析”

第42回薬剤耐性菌研究会(口頭発表) 熱海 ホテルニューさがみや 10月17日-18日

**木村幸司**、長野則之、長野由紀子、荒川宜親

“High Frequency of Fluoroquinolone- and Macrolide-resistant Streptococci among Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility” (2013)

28<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy and Infection (ICC), Yokohama パシフィコ横浜, 2013.6.5-8. P119, Selected Poster Discussion PD02

(ポスター及び口頭発表)

**木村幸司**、長野則之、長野由紀子、外山雅美、荒川宜親(2013)

“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)に関する最新知見”

第87回日本感染症学会学術講演会、第61回日本化学療法学会総会 合同学会 横浜 パシフィコ横浜 6月5日-6日 シンポジウム

29 耐性菌を科学する: グラム陽性耐性菌に関する知見のアップデート

(指定、口頭発表)

**木村幸司**、鈴木里和、和知野純一、柴山恵吾、荒川宜親(2013)

“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)は多剤耐性化傾向がある”

第86回日本細菌学会総会 千葉 幕張メッセ 3月18日-20日 PB-375

**木村幸司**、長野則之、長野由紀子、鈴木里和、和知野純一、柴山恵吾、荒川宜親(2013)

“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)は多剤耐性化傾向がある”

第24回日本臨床微生物学会総会 横浜 パシフィコ横浜 2月2日-3日

(口頭発表) O-110

山田景子、和知野純一、**木村幸司**、荒川宜親(2013)

“抗MRSA薬耐性黄色ブドウ球菌の調査とその疫学”

第24回日本臨床微生物学会総会 横浜 パシフィコ横浜 2月2日-3日

(口頭発表) O-080

長野則之、長野由紀子、外山雅美、**木村幸司**、柴山恵吾、荒川宜親(2013)

“セフチブテンディスクで阻止帯形成が認められないペニシリン感性B群連鎖球菌の分子学的解析”

第24回日本臨床微生物学会総会 横浜 パシフィコ横浜 2月2日-3日 P-057

**木村幸司**、長野則之、長野由紀子、鈴木里和、和知野純一、柴山恵吾、荒川宜親(2012)

“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌(PRGBS)は多剤耐性化傾向がある”

第49回日本細菌学会中部支部総会 金沢 金沢大学 11月9日-10日

(口頭発表)

山田景子、白井義憲、金万春、岡本陽、和知野純一、**木村幸司**、荒川宜親(2012)

“抗MRSA薬耐性黄色ブドウ球菌の調査とその疫学”

第49回日本細菌学会中部支部総会 金沢 金沢大学 11月9日-10日

(口頭発表)

山田景子、金万春、和知野純一、**木村幸司**、荒川宜親(2012)

“黄色ブドウ球菌のダプトマイシン感受性”

第41回薬剤耐性菌研究会(口頭発表) 下呂 望川館 10月25日-26日

山田涼子、**木村幸司**、長野則之、長野由紀子、鈴木里和、和知野純一、岡本陽、山田景

なし

子、柴山恵吾、荒川宜親(2012)  
“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌とペニシリン感受性B群連鎖球菌の遺伝的背景の比較検討”  
第41回薬剤耐性菌研究会(口頭発表) 下呂望川館 10月25日-26日  
長野則之、長野由紀子、外山雅美、**木村幸司**、柴山恵吾、荒川宜親(2012)  
“セフチブテンディスクで阻止帯形成が認められないペニシリン感受性B群レンサ球菌の分子学的解析”  
第41回薬剤耐性菌研究会(口頭発表) 下呂望川館 10月25日-26日  
山田景子、白井義憲、金万春、岡本陽、和知野純一、**木村幸司**、荒川宜親(2012)  
“黄色ブドウ球菌の抗MRSA薬の感受性調査”  
第41回薬剤耐性菌研究会(口頭発表) 下呂望川館 10月25日-26日  
**木村幸司**、長野則之、長野由紀子、外山雅美、荒川宜親(2012)  
“連鎖球菌感染症にみられる新しい知見”  
第61回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第59回日本化学療法学会東日本支部総会、合同学会 東京 ホテル日航東京 10月10-12日 教育講演7  
(招待、口頭発表)

〔産業財産権〕  
取得状況(計 2件)

名称：B群連鎖球菌を検出するためのプライマーセット及びその利用  
発明者：荒川宜親、**木村幸司**、柳沢英二  
権利者：国立感染症研究所長、株式会社ミロクメディカルラボラトリー  
種類：特許  
番号：特許第 5153726号  
取得年月日：平成 25年 2月 27日  
国内外の別： 国内

名称：ペニシリン耐性B群連鎖球菌(Group B streptococcus)を識別する方法及び識別用キット  
発明者：**木村幸司**、黒川博史、荒川宜親  
権利者：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団  
種類：特許  
番号：特許第 4956721号  
取得年月日：平成 24年 6月 20日  
国内外の別： 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 幸司 (KIMURA Kouji)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：50425675

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者