

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461501

研究課題名(和文)カルバペネム系抗菌薬全般に低感受性であるインフルエンザ菌の低感受性機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of Haemophilus influenzae with reduced carbapenem susceptibility

研究代表者

木村 幸司(Kimura, Kouji)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50425675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カルバペネム低感受性のインフルエンザ菌が臨床分離されたため、そのカルバペネム低感受性機構を解析した。カルバペネム系薬の標的分子、ペニシリン結合タンパクを解析したところ、挿入変異を有することを明らかにした。この挿入変異により、カルバペネム低感受性となることを、自然形質転換体、ペニシリン結合タンパク競合実験等により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Because we obtained a clinical isolate of Haemophilus influenzae with reduced carbapenem susceptibility, we analyzed the mechanisms of the reduced carbapenem susceptibility. By the sequencing analysis, we revealed that this clinical isolate harbored insertion in the penicillin-binding protein. We revealed that this insertion was responsible for reduced carbapenem susceptibility by the analysis of natural competent cell and the penicillin-binding protein competitive assay et al..

研究分野：細菌学、感染症学

キーワード：薬剤耐性 インフルエンザ菌 ペニシリン結合タンパク

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) は、発育因子として X 因子(ヘミン)と V 因子(NAD)を必要とするグラム陰性桿菌である。インフルエンザ菌のうち、莢膜型 b 型は、小児の敗血症、髄膜炎の起因菌として、重要な位置を占めてきたが、近年の Hib ワクチンの導入により劇的に減少している。一方、非莢膜型は、小児の中耳炎、副鼻腔炎、気管支炎、肺炎、髄膜炎等の起因菌として依然、重要な位置を占め、我が国の小児中耳炎の起因菌のうち 24.2%がインフルエンザ菌であるとの報告もある。インフルエンザ菌感染症の治療には、アンピシリンなどのベータラクタム系薬が第一選択薬であるが、近年、ベータラクタム系薬の標的分子の一つである Penicillin-binding protein (PBP)3 に変異を獲得した BLNAR (beta-lactamase negative ampicillin resistant) や一部のベータラクタム系薬を分解する TEM-1, ROB-1 型のベータラクタマーゼを産生する BLPAR (beta-lactamase positive ampicillin resistant) の分離が増加してきており、臨床的に問題となってきている。ほぼ全ての BLNAR も BLPAR もベータラクタム系薬のうちカルバペネム系抗菌薬には良好な感受性を示してきた。しかしながら、我々はカルバペネム系抗菌薬全般に低感受性である臨床分離インフルエンザ菌 (NUBL1772, イミペネム MIC 16 µg/ml, ピアペネム MIC >8 µg/ml) を既に入手し、予備的実験からこの株は PBP3 にアミノ酸挿入変異を有すること(表 1)を既に明らかにした。

表1. PBP3の推定アミノ酸配列

菌株	520	526	530	540
Rd	E N H Y V V	N K Y V A F T A G I A P I S D		P
NUBL1772	E N G H Y V	M N K H V A F T A G I A P I S D		

2. 研究の目的

本研究課題では、カルバペネム系抗菌薬低感受性インフルエンザ菌 (NUBL1772) のカルバペネム低感受性機構を明らかにし、インフルエンザ菌においてカルバペネム耐性が始まりつつあることを報告し、臨床現場に注意を促すことで医療現場に還元することを目的とする。

3. 研究の方法

一般的なインフルエンザ菌 Rd は、メロペネム MIC 0.06 µg/ml、ドリペネム MIC 0.06 µg/ml、イミペネム MIC 0.5 µg/ml、ピアペネム MIC 0.5 µg/ml を示すが、カルバペネム系薬全般に低感受性(表 2)であるインフルエンザ菌 (NUBL1772) は、メロペネム MIC 1 µg/ml、ドリペネム MIC 4 µg/ml、イミペネム MIC 16 µg/ml、ピアペネム MIC 16 µg/ml を示す。カルバペネム系薬全般に低感受性であるインフルエンザ菌 (NUBL1772) のカルバペネム系薬低感受性機構を明らかにするため

に、以下の実験を行った。

表 2. 薬剤感受性

菌株	MIC ^a (µg/ml)						
	ABPC	A/C	CTRX	MEPM	DRPM	IPM	BIPM
Rd	0.25	0.5	≤0.03	0.06	0.06	0.5	0.5
NUBL1772	16	32	0.25	1	4	16	16
	R	R	S	S	-	R	-

^aABPC, ampicillin; A/C, Amoxicillin-clavulanate; CTRX, ceftriaxone; MEPM, meropenem; DRPM, doripenem; IPM, imipenem; BIPM, biapenem; S, 感性; R, 耐性; -, ブレークポイントなし
PK/PD parametersに基づいたブレークポイントを使用。

一つ目は『PBP3 のアミノ酸変異のうち、アミノ酸挿入変異が重要であるのか否か?』に答えるため、ベータラクタム系薬感受性インフルエンザ菌に変異 PBP3 (*ftsI*) または挿入変異欠損 PBP3 (*ftsI* M526 del) を導入し、カルバペネム系薬低感受性を獲得するか否かを検討した。

次に『変異 PBP3 はカルバペネム系薬に低親和性であるのか否か?』を明らかにするために、PBP3 及び変異 PBP3 を精製し、蛍光ペニシリン (Bocillin) を用いて、PBP 競合結合実験を行った。PBP3 及び変異 PBP3 への蛍光ペニシリン (Bocillin) の結合を半分ほど阻害する濃度 (IC₅₀) を、カルバペネム系薬を中心に各薬剤について算出した。

4. 研究成果

表 3 に示すように、変異 PBP3 遺伝子 (NUBL1772 *ftsI*) をインフルエンザ菌の標準株 Rd に導入すると、アンピシリン MIC 8 µg/ml、メロペネム MIC 1 µg/ml、ドリペネム MIC 4 µg/ml、イミペネム MIC 8 µg/ml、ピアペネム MIC 8 µg/ml とカルバペネム系薬の最小発育阻止濃度が親株と同等 (アンピシリン MIC 16 µg/ml、メロペネム MIC 2 µg/ml、ドリペネム MIC 4 µg/ml、イミペネム MIC 16 µg/ml、ピアペネム MIC 16 µg/ml) にまで上昇してくる。しかしながら、挿入変異を欠失させた変異 PBP3 遺伝子 (NUBL1772 *ftsI* M526 del) をインフルエンザ菌の標準株 Rd に導入すると、十分なカルバペネム系薬の最小発育阻止濃度の上昇が認められなかった (アンピシリン MIC 1 µg/ml、メロペネム MIC 0.12 µg/ml、ドリペネム MIC 0.5 µg/ml、イミペネム MIC 1 µg/ml、ピアペネム MIC 4 µg/ml)。このことから、PBP3 のアミノ酸変異のうち、アミノ酸挿入変異 (M526) が重要であることが示された。

表 3. 自然形質転換体の薬剤感受性

菌株 ^a	MIC ^b (µg/ml)				
	ABPC	MEPM	DRPM	IPM	BIPM
Rd	0.25	0.03	0.06	0.5	0.5
NUBL1772	16	2	4	16	16
Rd (NUBL1772 <i>ftsI</i>)	8	1	4	8	8
Rd (NUBL1772 <i>ftsI</i> M526 del)	1	0.12	0.5	1	4

^a*ftsI* は、PBP3 をコードする遺伝子。

^bABPC, ampicillin; MEPM, meropenem; DRPM, doripenem; IPM, imipenem; BIPM, biapenem

また、表4に示すように、PBP3 及び変異 PBP3 を精製し、蛍光ペニシリン(Bocillin)を用いて、PBP 競合結合実験を行った。PBP3 及び変異 PBP3 への蛍光ペニシリン(Bocillin)の結合を半分ほど阻害する濃度(IC₅₀)を、カルバペネム系薬を中心に各薬剤について算出したところ、Rd 由来の PBP3 では、アンピシリン IC₅₀ 0.13 µg/ml、メロペネム IC₅₀ 0.11 µg/ml、ドリペネム IC₅₀ 0.1 µg/ml、イミペネム IC₅₀ 0.46 µg/ml、ピアペネム IC₅₀ 0.34 µg/ml であったのに対し、NUBL1772 由来の変異 PBP3 は、アンピシリン IC₅₀ 3.51 µg/ml、メロペネム IC₅₀ 0.17 µg/ml、ドリペネム IC₅₀ 0.34 µg/ml、イミペネム IC₅₀ 0.81 µg/ml、ピアペネム IC₅₀ 4.24 µg/ml を示した。このことから、NUBL1772 由来の変異 PBP3 は、Rd 由来の PBP3 に比べて、アンピシリン及びカルバペネム系薬に低親和性であることが示された。

表 4. Bocillin と β-lactams の PBP3 proteins 結合実験

菌株	IC ₅₀ (µg/ml)				
	ABPC	MEPM	DRPM	IPM	BIPM
Rd	0.13	0.11	0.1	0.46	0.34
NUBL1772	3.51	0.17	0.34	0.81	4.24

*ABPC, ampicillin; MEPM, meropenem; DRPM, doripenem; IPM, imipenem; BIPM, biapenem

以上のことから、カルバペネム系抗菌薬低感受性インフルエンザ菌 NUBL1772 は、アミノ酸挿入変異(M526)を含むアミノ酸変異を PBP3 に獲得し、PBP3 がカルバペネム系薬に低親和性となることで、カルバペネム系抗菌薬低感受性となっていることが明らかになった(図1)。

図1 本研究課題の成果

- 1、カルバペネム系薬低感受性インフルエンザ菌を臨床分離
- 2、ペニシリン結合タンパク(PBP)3にアミノ酸挿入変異を含む変異を有することを解明
- 3、自然形質転換体による、PBP3 アミノ酸挿入変異の重要性の証明
- 4、変異 PBP3 が、カルバペネム系薬に低親和性であることを、蛍光ペニシリンを用いた PBP 競合実験で証明

学会発表等を通じて、医療現場に情報提供し、現場に還元

今回、解析したカルバペネム系抗菌薬低感受性インフルエンザ菌 NUBL1772 は、ベータラクタム系薬の標的分子の一つである PBP3

に変異を獲得した BLNAR (beta-lactamase negative ampicillin resistant)の新型のタイプであることが明らかとなり、ベータラクタム系薬を分解する TEM-1, ROB-1 型のベータラクタマーゼを産生する BLPAR (beta-lactamase positive ampicillin resistant)の新型であることは否定的な結果を得た。ほぼ全ての BLNAR も BLPAR もベータラクタム系薬のうちカルバペネム系抗菌薬には良好な感受性を示してきたが、今回、解析したカルバペネム系抗菌薬低感受性インフルエンザ菌 NUBL1772 が出現し、今回の解析により、BLNAR の一部がカルバペネム系抗菌薬低感受性となっていることが明らかになった。今後、PBP3 に更なるアミノ酸変異が蓄積し、カルバペネム系薬の MIC 値が上昇していく可能性があり、注意が必要である。また、PBP3 以外の PBP にアミノ酸変異を獲得して、カルバペネム系薬の MIC 値が上昇していく可能性も想定する必要があると考えられる。

今回の解析では、特に、カルバペネム低感受性における、PBP3 のアミノ酸挿入変異(M526)の重要性が示された。これまで、PBP3 のアミノ酸挿入変異によるベータラクタム系薬耐性の報告は、我々の知る限り、インフルエンザ菌ではなく、今回の報告が世界初の PBP のアミノ酸挿入変異によるベータラクタム系薬耐性インフルエンザ菌の報告である。また、他の菌種を含めても、PBP3 のアミノ酸挿入変異によるベータラクタム系薬耐性の報告は、極めて限られており、今回の報告は、極めて貴重なものであると考えられる。

今回、解析したカルバペネム系抗菌薬低感受性インフルエンザ菌 NUBL1772 は、最後の切り札として臨床現場で使用されているカルバペネムに低感受性であるため、臨床的に重要な耐性菌であると考えられる。今後、類似の株の拡散状況、類似株がどのような感染症を引き起こすか？類似株が感染症を引き起こした際、カルバペネム系薬での治療に抵抗性を示すか？などが課題としてあげられ、今回の研究が多くの研究課題をもたらす、今後、本研究課題が多くの研究の端緒となることが予想され、その意義は大きい(図2)。

図2 本研究課題からもたらされる研究課題の例

- 1、類似株の拡散状況の把握
- 2、類似株が、どのような感染症を引き起こすか？
- 3、類似株が感染症を引き起こした場合に、カルバペネム系薬での治療に抵抗性を示すか？
- 4、PBP3 に更にアミノ酸変異を獲得した株が出現するか？
- 5、PBP3 以外の PBP にアミノ酸変異を獲得した株が出現するか？

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22件)

1. R. Taniguchi, K. Kimura*, A. Miyazaki, H. Banno, W. Jin, K. Yamada, J. Wachino, Y. Arakawa (2017)
“High rate of slowly-killed-by-ampicillin phenotype among group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS)”
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72(3):941-2. 査読有
*corresponding author
2. S. Fukigai[¶], M. Morimoto[¶], K. Kimura*, Y. Doyama, A. Miyazaki, C. Kamiya, H. Banno, E. Morishima, T. Onoda, N. Nagano, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, Y. Arakawa (2016)
“Effectual detection of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS) by commercially available methicillin-resistant-*Staphylococcus aureus* (MRSA)-selective agar”
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 85(3): 309-12 査読有
[¶] Equally contribution, *corresponding author
3. K. Kimura*, N. Nagano, Y. Arakawa (2015)
“Classification of group B streptococci with reduced β -lactam susceptibility (GBS-RBS) based on the amino acid substitutions in penicillin-binding proteins (PBPs)”
The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 70(6): 1601-3. 査読有
*corresponding author
4. A. Fujita, K. Kimura*, S. Yokoyama, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, H. Suematsu, Y. Yamagishi, H. Mikamo, Y. Arakawa (2015)
“Characterization of piperacillin/tazobactam-resistant *Klebsiella oxytoca* recovered from a nosocomial outbreak”

PLoS ONE 10(11): e0142366 査読有

*corresponding author

5. T. Seki, K. Kimura*, M. E. Reid, A. Miyazaki, H. Banno, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, Y. Arakawa (2015)

“High isolation rate of multi-drug resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in Japan”

The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 70(10): 2725-8. 査読有

*corresponding author

6. C. Kamiya, K. Kimura*, Y. Doyama, A. Miyazaki, M. Morimoto, H. Banno, N. Nagano, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, Y. Arakawa (2015)

“Ceftibuten-containing agar plate for detecting group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS)”

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 82(4): 269-73. 査読有

*corresponding author

7. T. Suzuki, K. Kimura*, H. Suzuki, H. Banno, W. Jin, J. Wachino, K. Yamada, Y. Arakawa (2015)

“Have group A streptococci with reduced penicillin susceptibility emerged?”

The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 70(4): 1258-9. 査読有

*corresponding author

8. Y. Nagasaka, K. Kimura, K. Yamada, J. Wachino, W. Jin, S. Notake, H. Yanagisawa, Y. Arakawa (2015)

“Genetic profiles of fluoroquinolone-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* among cephalosporin-resistant *K. pneumoniae*”

Microbial Drug Resistance 21(2): 224-33. 査読有

9. R. Yamada, **K. Kimura***, N. Nagano, Y. Nagano, S. Suzuki, W. Jin, **J. Wachino**, K. Yamada, K. Shibayama, **Y. Arakawa** (2015)
 “Comparative analysis of penicillin-susceptible and non-susceptible isolates in group B streptococci by multilocus sequence typing”
Japanese Journal of Infectious Diseases 68(4): 326-9. 査読有
 *corresponding author
10. N. Ishiwada, H. Hishiki, K. Nagasawa, S. Naito, Y. Sato, B. Chang, Y. Sasaki, **K. Kimura**, M. Ohnishi, K. Shibayama (2014)
 “The incidence of pediatric invasive *Haemophilus influenzae* and pneumococcal disease in Chiba prefecture, Japan before and after the introduction of conjugate vaccines.”
Vaccine 32(42): 5425-31. 査読有
11. **J. Wachino**, **K. Kimura**, K. Yamada, W. Jin, **Y. Arakawa** (2014)
 “Evaluation of disk potentiation test using KB disks containing high dosage fosfomycin and glucose-6-phosphate to detect the production of glutathione S-transferase responsible for fosfomycin resistance”
Journal Clinical Microbiology 52(10): 3827-8. 査読有
12. H. Banno, **K. Kimura***, Y. Tanaka, H. Kitanaka, W. Jin, **J. Wachino**, K. Yamada, K. Shibayama, **Y. Arakawa** (2014)
 “Characterization of multi-drug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS) forming small non-β-hemolytic colonies on sheep blood agar plates”
Journal Clinical Microbiology 52(6): 2169-71. 査読有
 *corresponding author

〔学会発表〕(計1件)

1. 北岡一樹、**木村幸司**、坂野弘嗣、金万春、**和知野純一**、**荒川宜親**(2017)
 “Novel Insertion in Penicillin-Binding

Protein 3 of Carbapenem-Resistant *Haemophilus influenzae*”

第90回日本細菌学会総会 仙台国際センター
 (宮城県仙台市) 3月19日～21日 ポスター
 番号P-293

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・准教授
 研究者番号: 50425675

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

荒川 宜親 (ARAKAWA, Yoshichika)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 10212622

和知野 純一 (WACHINO, Jun-ichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号: 00535651

(4)研究協力者

北岡 一樹 (KITAOKA, Kazuki)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生