

平成30年6月1日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06946

研究課題名(和文) タイの臨床現場において優勢なカルバペネム耐性菌株の特性

研究課題名(英文) Characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolateid in Southeast Asia

研究代表者

菅原 庸 (Sugawara, Yo)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：70452464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)は、使用可能なほぼ全ての抗菌薬に対して耐性をもち、その蔓延が世界で大きな問題となっている。本研究ではタイおよびミャンマーにおいて優勢なカルバペネム耐性菌株の性状を明らかにすることを目的とした。これらの地域で採集されたCRE株においては、カルバペネム耐性を付与する遺伝子の一つであるNDM遺伝子が蔓延しており、おもにミャンマー由来株の解析の結果、NDM遺伝子を搭載する2つのタイプのプラスミドが優勢であった。これら2つのプラスミドは異なる伝播パターンを示し、それに関連して薬剤耐性やプラスミドの伝達性において異なる特徴を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) has become worldwide concern. In this study, I sought to clarify the characteristics of the CRE strains prevalent in Southeast Asia and their relevance to epidemiology. In Myanmar, two types of plasmids harboring the NDM gene, one of the most prevalent carbapenemase gene worldwide, were prevalent among obtained CRE isolates. They showed different characters in terms of antimicrobial susceptibility and the efficiency of transfer, apparently supporting their differential spread.

研究分野：細菌学

キーワード：カルバペネム耐性 腸内細菌科細菌 プラスミド

1. 研究開始当初の背景

カルバペネム系抗菌薬は、その強力な幅広い抗菌活性から、重篤な細菌感染症に対する最後の砦として使用されてきた。しかし、近年はカルバペネムに耐性を示す腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: CRE) が欧米を中心に報告されており、また CRE は他の抗菌薬に対する耐性遺伝子をも有していることから高度に多剤耐性化している。したがって、このような細菌が原因となる感染症に対しては治療薬の持ち駒がないという事態に陥りかねない。カルバペネムに対する耐性化のメカニズムの主なものとしては、カルバペネムを分解する酵素であるカルバペネマーゼの産生があげられる。この遺伝子は *Serratia* 属細菌で当初見出されたものの、臨床分離株に広がらなかったことからそれほど注目されなかったが、近年では大腸菌 (*Escherichia coli*) や肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、エンテロバクター・クロアカ (*Enterobacter cloacae*) といった腸内細菌科細菌が、プラスミドにコードされているカルバペネマーゼ遺伝子を獲得することにより耐性化し、世界各地で急速に拡散している。このような細菌はしばしば院内感染により尿路感染症、肺炎や敗血症を引き起こし、後者の場合、患者の死亡率は 50% に達するとされる。

分子疫学研究から、世界各地で蔓延している CRE 各菌種の遺伝子型や、菌が保持しているカルバペネマーゼ遺伝子の分布が明らかにされつつあり、後者については、アメリカ合衆国では KPC、ヨーロッパでは KPC に加えて OXA-48、VIM、NDM、インドでは NDM や OXA-48 といった遺伝子を有する腸内細菌科細菌がしばしば検出されている。プラスミドにコードされているこれらの耐性遺伝子は、水平伝播により様々な菌種が獲得している。一方で、興味深いことに、それぞれの地域において蔓延している CRE 株の clonality には偏りが見られている。例えば、アメリカ合衆国でアウトブレイクを起こしている *K. pneumoniae* の 80% 近くが、KPC 遺伝子を有する特定の MLST シークエンスタイプ (ST258) に属しており、この株はアメリカ合衆国を含め 20 か国以上に広がっている。しかしながら、何故にこの ST 株が優勢なのかについてはほとんどわかっていない。

上述の通り、CRE の臨床現場での蔓延は放置できない重要な問題となっており、これへの対処は、特に欧米諸国において喫緊の課題となっている。近年の次世代シーケンサーの普及と性能の向上により、臨床現場で単離される CRE の全ゲノム配列を決定し、それらの系統解析を行うことが可能となっている。このような状況の中、世界各国の臨床で単離された CRE の分子疫学研究が行われており、その研究結果が次々と発表されている。しかしながら、これまでのところそれらの研究は概ね記述的な範疇にとどまっており、得られ

たデータについての生物学的な意義づけがほとんどなされていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者の所属する研究機関では、タイ国各地およびミャンマーの病院から CRE 株を得て、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンスのデータベースの作成を進めている。本研究では、それらのデータを活用し、さらにプラスミドの伝播パターンや菌株の薬剤耐性等の表現系も比較解析に加え、優勢な CRE 株が特異的に有している性状を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

カルバペネム耐性の臨床由来株は、研究協力者により、タイ及びミャンマーにて採集されたものを用いた。ミャンマー由来株については、臨床株を採集した病院の周辺地域の環境排水から分離した CRE 株も解析に含めた。分離株については、質量分析法により菌種同定を行った。また微量液体希釈法により、臨床で一般的に使用される抗菌薬に対する耐性を決定した。全ゲノムシーケンスは、PacBio RSII あるいは Illumina シーケンサーを用いて取得した。前者により得られたシーケンスリードは HGAP により、後者については CLC Genomics Workbench のアセンブルソフトウェアを用いてアセンブルし、以降の解析に用いた。各々の株が保持する薬剤耐性遺伝子とプラスミドのタイプは、データベース検索 (ResFinder、PlasmidFinder) により同定した。菌株間の系統関係は、全ゲノム SNP 解析プログラムである CSI Phylogeny を用いて解析した。

シーケンス決定に PacBio RSII を用いていない株におけるカルバペネマーゼ搭載プラスミドの同定は、S1-PFGE・サザンプロットにより行った。サザンプロットのプローブとしては、カルバペネマーゼあるいはプラスミドのレプリコンタイプに特異的なものを用いた。カルバペネマーゼ搭載プラスミドの形質転換体は、分離株から精製したプラスミド DNA を大腸菌実験室株にエレクトロポレーションにより導入し、メロペネム含有培地上で選択することにより得た。カルバペネマーゼ搭載プラスミドの接合伝達性の検定は、プラスミドを保有する菌株 (供与株) とリファンピシン耐性の実験室株 (受容株) を混合し、メロペネム・リファンピシン含有寒天培地上で接合完了体を選択することにより行った。

4. 研究成果

研究計画段階では、研究代表者の所属する研究グループが収集済みのタイ国由来の CRE について解析する予定であったが、研究期間中に想定以上にミャンマーからの分離株が多く得られ、また、研究開始当初にはミャンマーにおける CRE の分離報告例がなかったため、研究期間を通してミャンマー分離株の解

析を優先して行った。

ミャンマー由来 CRE 計 92 株の全ゲノムシークエンス及びカルバペネマーゼ搭載プラスミドを比較解析した結果、以下の点を明らかにした。

(1) 92 株中 91 株、ほぼ全ての株で NDM タイプのカルバペネマーゼ遺伝子を検出した。また、4 株で OXA-48 型に分類されるカルバペネマーゼである OXA-181 を検出した。NDM 遺伝子が蔓延している状況はタイ国と同様であり、この遺伝子がミャンマーにおいても優勢に拡がっている状況が明らかとなった。

(2) 大腸菌株が 49 株分離され、全体の半数以上を占めていた。それらは 9 つの MLST シークエンスタイプを含んでおり、多様なものが含まれることが明らかとなった。それらのうち、ST167 とその近縁系統が 20 株を占めており優勢であった。一方で、これらの大腸菌株が保持する NDM 搭載プラスミドのタイプは、IncFII タイプのプラスミドのものがほとんどであった (49 株中 37 株、76%)。この観察結果は、ある特定の系統というよりも、NDM 搭載プラスミドの伝播がカルバペネム耐性の大腸菌の伝播を反映していると考えられた。このタイプのプラスミドは、NDM 遺伝子を搭載しているが、それ以外にもアミノグリコシドやサルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST) 合剤、マクロライドに対する耐性遺伝子を保持していた。実際にこのプラスミドの形質転換体は、プラスミドを保持しない親株と比較してメロペネムに対する感受性が下がると同時に、アミノグリコシドと ST 合剤に対しても耐性となり、プラスミドの宿主となる菌に対して多剤耐性を付与することが明らかとなった。このタイプのプラスミドを持つ大腸菌の多く (37 株中 22 株、60%) は血液内科病棟で分離されている。血液内科病棟では抗菌薬の投与量や投与頻度が高いことが知られており、このような条件においては、多剤耐性のプラスミドを保持することが、菌にとって優位になることが考えられた。

(3) IncFII 型のプラスミドに次いで多い NDM 搭載プラスミドとして、IncX3 タイプのプラスミドを同定した (92 株中 24 株、26%)。このタイプのプラスミドは、計 9 菌種を含む多様な菌株から検出されており、菌の個体間を伝播しやすい性質があることが示唆された。そこで、この IncX3 タイプのプラスミドの接合伝達効率について、同じくミャンマーで蔓延している上述の IncFII タイプのプラスミドを比較対象として測定した結果、ほとんど差は見られなかった。一方で、接合伝達の至適温度には差があり、IncFII タイプは 35 前後で効率が低いのに比して、IncX3 タイプでは 25 で最大の伝達効率を示した。この結果は、環境由来株の半数が IncX3 タイプのプラスミドを保有していた (14 株中 7 株) とい

う観察結果と関連し、環境中における伝播のしやすさが、このプラスミドを保持する株が蔓延していることの原因の一つである可能性が考えられた。

以上の結果から、ミャンマーにおける CRE の蔓延の大部分は特定の NDM 搭載プラスミド、IncFII と IncX3 タイプのプラスミドの伝播により説明できることが明らかとなった。これら 2 つのタイプのプラスミドは伝播パターンが異なっており、前者は多剤耐性プラスミドであり臨床における伝播が顕著であったのに対して、後者は環境由来株を含む多様な菌への伝播が見られた。これらのタイプの NDM 遺伝子搭載プラスミドはすでに我が国においても分離例が報告されている。本研究で得られた知見は、このようなプラスミドを保持する CRE が検出された際に、それらの伝播経路の予測や更なる伝播拡大の阻止等、対応策を立てる上での知的基盤になるであろう。

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 1 件)

Sugawara Y, Akeda Y, Sakamoto N, Takeuchi D, Motooka D, Nakamura S, Hagiya H, Yamamoto N, Nishi I, Yoshida H, Okada K, Zin KN, Aye MM, Tomono K, Hamada S. Genetic characterization of *bla*_{NDM}-harboring plasmids in carbapenem-resistant *Escherichia coli* from Myanmar. PLoS One, 12: e0184720 (2017), DOI: 10.1371/journal.pone.0184720

[学会発表](計 3 件)

・菅原庸、明田幸宏、萩谷英大、坂本典子、竹内壇、山本倫久、岡田和久、朝野和典、浜田茂幸、ミャンマー連邦共和国の臨床及び環境由来腸内細菌科細菌における NDM 搭載プラスミドの伝播、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年

・菅原庸、明田幸宏、坂本典子、竹内壇、浜田茂幸、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の大規模全ゲノム解析：ミャンマーにおける分離株の例、第 12 回日本ゲノム微生物学会年会、2018 年

・菅原庸、坂本典子、竹内壇、萩谷英大、山本倫久、朝野和典、明田幸宏、岡田和久、浜田茂幸、ミャンマー連邦共和国において分離されたカルバペネム耐性大腸菌は多様な NDM 搭載プラスミドを保有する、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 庸 (SUGAWARA, Yo)
大阪大学・微生物病研究所・特任助教(常勤)
研究者番号：70452464

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

萩谷 英大 (HAGIYA, Hideharu)