

令和元年6月3日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07221

研究課題名(和文) 臨床分離されたカルバペネマーゼ産生グラム陰性菌の経時的分子疫学

研究課題名(英文) Molecular epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

研究代表者

土井 洋平 (Doi, Yohei)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：40332366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)はカルバペネム系を含む多くの抗菌薬に耐性を示す。本研究では2014年から2016年に国内の単一医療施設で確認されたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)陽性症例72例を検討した。感染症と判定された症例は29例で、肺炎が13例、尿路感染症が7例、腹腔内感染症が5例を占め、その30日総死亡率は29%だった。全72株に対しゲノム解析を行ったところ、71株がIMP-1カルバペネマーゼ遺伝子を保有していた。また、主要菌種のエンテロバクター・クロアカと肺炎桿菌それぞれで特定の菌のタイプ(シーケンスタイプ)が過半を占めていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)はカルバペネム系を含む多くの抗菌薬に耐性を示すことから、治療困難な感染症の原因として問題視されている。今回の単一施設研究では、本邦の他の施設からも報告されているようにエンテロバクター・クロアカと肺炎桿菌がCPEの主要な菌種であり、IMP-1型カルバペネマーゼ(カルバペネム抗菌薬を分解できる酵素)を産生していることが分かった。一方、ST517という、これまでほとんど報告がないタイプの肺炎桿菌が多く検出された点が注目される。この肺炎桿菌ST517について、今後さらにその遺伝学的背景などを検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) bacterial strains are resistant to multiple classes of antibiotics including carbapenems. Here, we investigated 72 CPE isolates identified from 71 patients at a single hospital in Japan between 2014 and 2016. Twenty-nine of the cases represented infection, including pneumonia (13), urinary tract infection (7) and intra-abdominal infection (5). The overall 30-day mortality was 29%. Seventy-one of 72 isolates possessed IMP-1 carbapenemase gene. By multilocus-sequence typing, 29 of 44 Enterobacter cloacae isolates belonged to ST78, and 19 of 28 Klebsiella pneumoniae isolates belonged to ST517.

研究分野：薬剤耐性菌

キーワード：カルバペネム耐性 細菌感染症 薬剤耐性菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 医療関連感染症の主要な起炎菌である大腸菌、肺炎桿菌、エンテロバクターなどの腸内細菌科細菌は、本来は多くの抗菌薬に感性であるものの、セファロスポリンなど多剤に耐性を獲得した株が増加している。これら多剤耐性菌による感染症の治療には主にカルバペネム系抗菌薬が用いられ良好な治療成績を収めてきた。しかし近年、カルバペネムにも耐性を獲得した腸内細菌科細菌 (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) が世界的に出現してきている。

CRE がカルバペネム耐性を獲得するメカニズムとしては、カルバペネム分解能を持つ  $\beta$ -ラクタマーゼ (カルバペネマーゼ) の産生が最も寄与している。カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) ではカルバペネマーゼ遺伝子がプラスミドを介して菌種間で広がることから、CRE の中でも特に拡散の危険が高いとされる。

(2) JANIS 検査部門の公開データによれば、本邦の医療現場における腸内細菌科細菌のカルバペネム耐性率は 0.2 - 1.4% 程度と推定され、比較的 low rate を保っている。しかし、例えばギリシャでは肺炎桿菌の CRE 率が既に 60% を越えるなど、一旦増加局面に入るとそのコントロールには困難を伴うと予想される。CPE が産生するカルバペネマーゼとしては、世界的には KPC 型、NDM 型、OXA-48 型が多いが、本邦のカルバペネマーゼは IMP 型が多数を占めることが知られている。

## 2. 研究の目的

本研究は、申請施設で既に収集・保存されていた CPE 菌株を用い、その分子疫学を検討することを目的とした。プロジェクトを効率的に進めるため、本研究では個別の PCR やシーケンスを行う代わりに、最初から全ゲノムを次世代シーケンサーにてシーケンスし、このデータから各種分子疫学解析手法 (MLST、プラスミドのレプリコンタイピング、系統樹作成など) を *in silico* で行うことで、菌体およびプラスミドのクローン性、ならびにその多剤耐性への寄与について包括的な知見を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

申請施設で 2014 年から 2016 年までに収集された CPE 菌株、およびこれに関連する臨床症例を対象とした。

各 CPE 症例につき、患者背景、CPE による感染症の有無、治療内容、臨床転帰に関する情報を収集し分析

全ゲノムの単断片シーケンスにより、各菌株のシーケンスタイプ (ST)、カルバペネマーゼ遺伝子を含む各種耐性遺伝子の保有状況、プラスミドの Inc 型を網羅的に解析

シーケンスデータより各菌種毎に系統樹解析を行い、CPE のクローン性を検討

カルバペネマーゼ遺伝子を保有するプラスミドを単離し、Inc 型、サイズ、切断パターン (RFLP)、接合性、その他の耐性遺伝子を検索 (ただし、本研究費の採択以降に Oxford Nanopore MinION の普及により長断片シーケンスが実施できるようになったため、プラスミド全体の構造解析についてはこの方法に変更した)

代表的なプラスミドの全体構造を長断片シーケンスにより決定

## 4. 研究成果

2014 年 1 月から 2016 年 12 月までに 71 患者より 72 株の CPE が分離された。平均年齢は 67.5 ± 19.5 歳で、男性が 58% を占めた。菌種としては *Enterobacter cloacae* が 44 株、*Klebsiella pneumoniae* が 28 株だった。検体は呼吸器検体が 40 株、尿検体が 12 株、血液検体が 7 株、その他が 13 株だった。患者背景としては、直近 3 か月以内に手術を受けた患者が 28 名、ICU に入院した患者が 33 名、抗菌薬投与を受けた患者が 64 名と、医療暴露が強く関連していた。また入院から CPE 検出までの日数は 54 日 (中央値、四分位範囲 18 - 82 日) だった。30 日死亡率は 17%、90 日死亡率は 28% で、41% が再入院した。71 例のうち感染症に関与していたと考えられたのは 41% で、残りは保菌または定着だった。感染症の種類としては肺炎 (13 例)、尿路感染症 (7 例)、腹腔内感染症 (5 例)、その他 (4 例) だった。経験的治療はカルバペネムが最も多く (11 例)、確定的治療はフルオロキノロン (6 例) とアミノグリコシド (5 例) が最も多かった。以上をまとめると、CPE 検出例のうち実際の感染症例は 4 割程度であり、主に非  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬で治療されているものの、総死亡率は比較的高かったといえる。ただ、ベースラインの重症度が高い患者が多く、CPE 感染症が直接に死因となった症例は少なかった可能性がある。

*E. cloacae* 44 株、*K. pneumoniae* 28 株を Illumina MiSeq でシーケンスした。MLST では *E. cloacae* 44 株のうち 29 株が *E. hormaechei* ST78 で、*E. hormaechei* ST133 が 3 株でこれに続いた。全株が IMP-1 カルバペネマーゼ遺伝子を保有しており、このうち 7 株を Oxford Nanopore MinION にて長断片シーケンスしたところ、IMP-1 遺伝子は 5 株でプラスミド上

(IncHI2 または IncFII/FIB 型) 2 株で染色体性に存在することが分かった。一方 *K. pneumoniae* は 28 株のうち 19 株が MLST により ST517 であり、5 株が ST76 でこれに続いた。ST517 はこれまで韓国から 1 株の登録があるのみで、CPE でこのように多数の株が同定されたのは今回が初めてである。IMP-1 遺伝子は 28 株中 27 株で検出されたが、長断片シーケンスを行った ST517 の 2 株では共に IMP-1 遺伝子が染色体上に存在したことから、ST517 は染色体上に安定して IMP-1 を保持しており、これにより固定したカルバペネム耐性が ST517 の拡散に寄与している可能性がある。

*K. pneumoniae* で新規、かつ頻度の高かった ST517 のうち 2 株のゲノムを長断片シーケンスにより完全長で決定したところ、1 株 (FUJH0038 株) では IMP-1 遺伝子が 3 コピー検出された (染色体上に 1 コピー、283 キロベースの IncFII/FIB プラスミドに 1 コピー、77 キロベースの IncFII プラスミドに 1 コピー)。また、もう 1 株 (FUJH0040 株) でも IMP-1 遺伝子が 3 コピー検出された (染色体上に 1 コピー、282 キロベース IncFII/FIB プラスミドに 1 コピー、77 キロベースの IncFII プラスミドに 1 コピー)。*E. cloacae* では、長断片シーケンスした 7 株全てで IMP-1 遺伝子は 1 コピーであり、染色体上のものが 2 株、IncHI2 プラスミド上のものが 4 株 (299-369 キロベース)、IncFII/FIB プラスミド上のものが 1 株 (191 キロベース) だった。これらのプラスミドの詳細な遺伝構造については今後さらに精査し論文文化していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木匡広、伊藤亮太、和久田光毅、石井潤一、土井洋平 ドラフトゲノムによる **IMP-1** 保有プラスミド拡散様式の検討 第 47 回薬剤耐性菌研究会 2018 年 11 月 松本

土井洋平 **CPE・CRE** 感染症を科学する 第 30 回日本臨床微生物学会総会・学術総会 2019 年 2 月 東京

鈴木匡広、伊藤亮太、土井洋平 IMP-1 保有プラスミド拡散様式の検討 第 93 回日本感染症学会総会・学術講演会 2019 年 4 月 名古屋

土井洋平 Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE): epidemiology, diagnosis and treatment 第 93 回日本感染症学会総会・学術講演会 2019 年 4 月 名古屋

鈴木匡広、土井洋平 ORF 構成による IncF プラスミドのグループ化 第 92 回日本細菌学会総会 2019 年 4 月 札幌

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 匡広  
ローマ字氏名：スズキ マサヒロ  
所属研究機関名：藤田医科大学  
部局名：医学部微生物学講座  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：70446649

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 大介  
ローマ字氏名：スズキ ダイスケ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。