

平成30年6月22日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05280

研究課題名(和文) ミャンマーにおける薬剤耐性グラム陰性細菌の分子疫学

研究課題名(英文) Molecular epidemiology of drug-resistant Gram-negative pathogens in Myanmar

研究代表者

切替 照雄 (KIRIKAE, Teruo)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：50192563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミャンマーの医療施設で分離された543株の薬剤耐性グラム陰性細菌はミャンマーの18医療機関から分離された。ゲノム解析は16S rRNAによる菌種同定、薬剤耐性因子同定および全ゲノムベースの分子系統解析を行った。その結果、これらの菌株の遺伝子解析によりカルバペネマーゼをコードする遺伝子およびアミノグリコシド高度耐性に関与する16S rRNAメチラーゼをコードする遺伝子を保有し、これらの耐性因子がカルバペネム耐性およびアミノグリコシド高度耐性に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A total of 453 isolates were obtained in 18 medical settings in Myanmar. Molecular epidemiological analysis was revealed that 172 *Escherichia coli* isolates, 71 *Klebsiella pneumoniae* isolates, 2 *Burkholderia cepacia* isolates, 4 *Citrobacter freundii* isolates, 28 *Enterobacter* spp. isolates, 1 *Morganella morganii* isolate, 2 *Pantoea* spp. isolates, 3 *Proteus mirabilis* isolates, 3 *Providencia* spp. isolates, 178 *Pseudomonas* spp. isolates, 1 *Ralstonia solanace* isolate, 1 *Serratia marcescens* isolate and 4 *Shingomonas paucimobilis* isolates were identified by 16S rRNA sequencing. These isolates harbored genes encoding metallo-β-lactamases and these carbapenemases encoding genes were associated with carbapenem resistance. In addition, these isolates harbored genes encoding 16S rRNA methylases and these 16S rRNA methylases encoding genes were associated with extremely highly aminoglycoside resistance in these isolates obtained in medical settings in Myanmar.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤耐性菌 分子疫学解析 グラム陰性菌 アミノグリコシド耐性 カルバペネム耐性 ミャンマー

1. 研究開始当初の背景

種々の多剤耐性菌が医療施設を中心に新興し、地球規模で拡大している(Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2015: WHO)。抗菌薬の切り札と考えられているカルバペネムに耐性の細菌が院内感染の原因菌として分離されるようになり、多剤耐性菌が感染症の治療成績を著しく低下させ、多くの国々で死亡率を押し上げる要因となっている。ミャンマーの医療施設では多剤耐性菌の蔓延が危惧されているが、その実態は全く明らかになっていない。多剤耐性菌の監視および解析のための研究拠点を構築することは、ミャンマーの感染対策および医療安全における最重要課題の一つである。本研究の目的は、ミャンマーの医療施設における薬剤耐性因子を同定し、多剤耐性グラム陰性菌の実態を明らかにし、さらに全ゲノム解析による分子疫学の有効性を実証することである。そのために、ミャンマーの国立衛生研究所(National Health Laboratory)と共同で多剤耐性グラム陰性細菌の分子疫学解析を実施した。

2. 研究の目的

ミャンマーの医療施設で分離される多剤耐性グラム陰性菌の実態が分子疫学的手法によって初めて明らかにされる。全ゲノム情報に基づく分子系統解析を行うことにより、流行株を特定し、その特性、具体的には、カルバペネム耐性に関わる薬剤耐性因子(メタロ-β-ラクタマーゼ等のカルバペネマーゼ)、アミノグリコシド耐性に関わる薬剤耐性因子(16S rRNA メチラーゼおよびアミノグリコシド修飾酵素)、近年、多剤耐性グラム陰性菌の治療薬として使用されているコリスチ

ンやチゲサイクリン耐性に関与する耐性因子を明らかにすることを目指した。本研究を実施するにあたり、2014年4月3日に国立国際医療研究センターとミャンマー連邦共和国保健省保健局との間で締結された共同研究契約(Agreement of Research Cooperation)に基づき、同年10月、ミャンマー国立衛生研究所およびヤンゴン総合病院微生物部門と共同で、「ミャンマーで分離される耐性菌に関する共同研究プロトコル:全ゲノム解析に基づく多剤耐性グラム陰性菌の分子疫学」を作成した。本プロトコルを基に、2016年3月22日にミャンマー保険スポーツ省倫理委員会の承認を得た(Letter No. Ethical Committee 2016)。3. 研究の方法

具体的な研究方法は、ミャンマーの医療施設で分離されたグラム陰性細菌を分離・収集ディスク法を用いた薬剤感受性試験および自動細菌同定検査装置バイテック2による菌種同定・薬剤感受性プロファイルの作製に基づく多剤耐性菌スクリーニング スクリーニングされた多剤耐性菌を国立国際医療研究センターに移送し、ゲノム抽出、次世代シーケンサーを用いた多剤耐性菌全ゲノムベースの分子系統解析 ミャンマーで蔓延している薬剤耐性因子の同定を実施した。

4. 研究成果

ミャンマーの医療施設で分離されたグラム陰性細菌の分離・収集の結果、ミャンマーの17医療機関から合計543株の薬剤耐性菌を分離した。当初はミャンマー3医療機関(ヤンゴン総合病院、新ヤンゴン総合病院およびヤンゴン小児病院)との共同研究であったが、2017年10月現在ではミャンマーの17医療機

関にまで AMR ネットワークを広げることができた。3年間で合計 600 株の分離・収集を目的としてきたが、本研究により分離された薬剤耐性菌は 543 株であり、目標の分離数には及ばなかった。

ミャンマーの医療施設で分離された 543 株の薬剤耐性グラム陰性細菌はミャンマーの 18 医療機関（ヤンゴン 500 床病院、バゴー総合病院、マンダレー中央婦人病院、マグウェイ総合病院、マンダレー総合病院、ミッチナ総合病院、ネピドー1000 床病院、新ヤンゴン総合病院、マンダレー公衆衛生研究所、ピエイ合病院、サンピャ総合病院、タウンゲー総合病院、西ヤンゴン総合病院、ヤンキン小児病院、ヤンゴン小児病院、ヤンゴン総合病院、モーラマイン総合病院およびヒンタダ総合病院）から分離され、ミャンマー国立衛生研究所にて自動細菌同定検査装置バイテック 2 による菌種同定・薬剤感受性プロファイルを決定した。その後、国立国際医療研究センター研究所感染症制御研究部に移送し、2 段階希釈法にて薬剤感受性プロファイルの作製、ゲノム抽出、次世代シーケンサによるゲノム解析を実施した。ゲノム解析は 16S rRNA による菌種同定、薬剤耐性因子同定および全ゲノムベースの分子系統解析を行った。

その結果、大腸菌 172 株、肺炎桿菌 71 株、*Achromobacter* spp. 3 株、*Acinetobacter* spp. 68 株、*Burkholderia cepacia* 2 株、*Citrobacter freundii* 4 株、*Enterobacter* spp. 29 株、*Morganella morganii* 1 株、*Pantoea* spp. 2 株、*Proteus mirabilis* 3 株、*Providencia* spp. 3 株、*Pseudomonas* spp. 178 株、*Raoultella ornithinolytica* 1 株、*Serratia marcescens* 1 株 および *Sphingomonas*

paucimobilis 4 株が同定された。これらの菌株の遺伝子解析によりカルバペネマーゼをコードする遺伝子 *blaIMP-1*, *blaDIM-1*, *blaNDM-1*, *blaNDM-4*, *blaNDM-7*、*blaOXA-232*(*blaOXA-48-like*) および *blaVIM-1* *blaVIM-2* が同定された。さらにこれらの菌株はアミノグリコシド高度耐性に関与する 16S rRNA メチラーゼをコードする遺伝子 *armA*, *rmtB*, *rmtC* および *rmtD3* を保有し、これらの耐性因子がカルバペネム耐性およびアミノグリコシド高度耐性に寄与していることが示唆された。

RmtD3 は *RmtD* の新規バリエーションであり、多剤耐性緑膿菌より同定された。*RmtD3* と *RmtD* のアミノ酸配列を比較すると 9 つのアミノ酸変異 (*Trp26Cys*, *Val39Ala*, *Met66Leu*, *Ser102Ile*, *Thr130Ala*, *Asn165Asp*, *Leu169Met*, *Ala181Thr* and *Gly236Ser*) が認められた。

カルバペネマーゼ以外の基質拡張型 -ラクタマーゼ (ESBL) において、多剤耐性アシネトバクターバウマニー株から新規基質拡張型 -ラクタマーゼバリエーション PER-9 を同定した。PER-9 は PER-1 と比較すると、129 番アミノ酸がグルタミンからロイシンに変異していた。

以上の結果から、ミャンマーの医療現場から分離される多剤耐性菌はカルバペネム高度耐性に寄与するカルバペネマーゼやアミノグリコシド高度耐性に寄与する 16S rRNA メチラーゼを産生する菌が蔓延していることが示唆された。

DNA クロマトグラフによる迅速診断法の開発においてはミャンマーの医療現場でより簡便に使用できるイムノクロマトグラム

の開発に変更し、ミャンマーで分離されるアミノグリコシド高度耐性菌の多くが産生している 16S rRNA メチラーゼ ArmA 産生を迅速に同定するキットを開発した。

本研究から、カルバペネマーゼをコードする遺伝子においてはヨーロッパ型、インド型およびアジア型のメタロ-β-ラクタマーゼが混在していることが明らかとなった。本研究を通して以下の2つの問題点が顕在化してきた。病院検査室では細菌検査体制が未熟である。ミャンマーでは細菌分離培地及び薬剤感受性試験用培地が市販されていないため、検査を行うには各病院で培地作製から準備する必要があることがこの問題の背景にある。種々の薬剤耐性因子による多剤耐性化が進んでいること。ミャンマーは、薬剤耐性化が進んでいる東にタイ、北に中国、西にインドに囲まれている。この地政学的特性が薬剤耐性菌の伝播に関与していることが強く示唆された。

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)

Tada T, Shimada K, Mya S, Zan KN, Kuwahara K, Kirikae T, Tin HH: A new variant of 16S rRNA methylase, RmtD3, in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother* 62. pii: e01806-17, 2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

切替 照雄 (KIRIKAE, TERUO)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：50192563

(2)研究分担者

多田 達哉 (TADA, TATSUYA)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00624644

(3)連携研究者

仲佐 保 (NAKASA, TAMOTSU)
国立国際医療研究センター・国際医療協力局・国際派遣センター長
研究者番号：10517329