

平成 30 年 4 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08638

研究課題名(和文) アシネトバクテラ属におけるオーダーメイド治療戦略の新規確立に関する研究

研究課題名(英文) Nobel therapeutic strategy for carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp.

研究代表者

遠藤 史郎 (Endo, Shiro)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：40614491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Acinetobacter属には多数の菌種が属しており、薬剤耐性も含めた病原性の違いなどが指摘されているが詳細は分かっていない。Acinetobacter属は喀痰から多く分離されることから喀痰分離株を用いて、薬剤耐性を含めた病原性の解析を行った。Acinetobacter gen. sp. 13BJより、抗菌薬耐性遺伝子として、IMP-34が検出された。IMP-34産生Acinetobacter gen. sp. 13BJは、本邦初の報告である。本遺伝子がプラスミド上に存在すること、本菌種がコリスチンに自然耐性を示すことから、今後もっとも注意が必要な菌種であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of drug-resistant *Acinetobacter* spp. has increased and is a serious concern worldwide. The aims of this study were to clarify species-level identification, antibiotic susceptibilities, and mechanisms of carbapenem resistant of *Acinetobacter* spp. using 60 *Acinetobacter* clinical isolates from sputum specimens in Japan. Genomic species were identified by sequencing of the *rpoB* gene. MICs were determined by the agar dilution method following CLSI guidelines (M100-S25). Carbapenemase genes and the genetic environment were investigated by PCR and DNA sequencing. Five *Acinetobacter* spp. isolates were resistant to carbapenem and encoded the IMP-34 gene. These five strains harboured a class 1 integron and carried a gene cassettes. In this study, we described the distribution and species level identification of *Acinetobacter* spp. isolated from sputum specimens in Japan. These included IMP-34 producers, which is the first detection of IMP-34 among *Acinetobacter* spp.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：Acinetobacter

## 1. 研究開始当初の背景

*Acinetobacter* 属は土壌や水系などの環境に常在しているブドウ糖非発酵菌である。栄養分の少ない病院内の環境表面においても増殖可能である特徴を有している。*Acinetobacter* 属は医療関連施設において、免疫力が正常な人で問題となることは比較的少ないが、免疫力の低下したコンプロマイズド宿主に対して原因菌となり感染症をおこす事が多く、さらには、種々の抗菌薬へ耐性を示すことが知られていることから、治療に難渋することが多い。海外では各種抗菌薬に耐性を示す *Acinetobacter* 属による感染症が治療に難渋することから社会問題にもなっている。近年、国内においても多剤耐性 *Acinetobacter* 属による重篤な感染症が多数報告され、本菌による集団発生も報告されている。したがって、*Acinetobacter* 属感染症を制御していくことは喫緊の課題である。さらに、*Acinetobacter* 属は菌種ごとにその病原性・予後が異なる可能性が報告されている (J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 1839-46.)。したがって、重症感染症である敗血症のような病態では菌種を正確に同定し、菌種に応じた適切な治療を行うことが望まれると報告されている (Emerg Infect Dis. 2014; 20: 1574-6.)。

一般的に、*Acinetobacter* 属の中では *A. baumannii* の分離頻度が最も高く 70% 以上と言われてきたが、申請者らの研究では血液培養から分離された *Acinetobacter* 属において、*A. soli* が最も多く分離され、次いで *A. nosocomialis*, *A. baumannii*, *A. ursingii*, *A. pittii* が多く分離され *A. baumannii* 以外の分離頻度が高いことが明確になった (J Clin Microbiol. 2014; 52: 911-5.)。

正確な菌種レベルまでの同定は研究室レベルにおいては可能であるものの、日常診療における現場レベルでは、*Acinetobacter* 属の生化学的性状が属内で酷似していること

から、自動細菌同定機器では困難であることが知られている。したがって、日常診療では *Acinetobacter* 属までしか同定できず、菌種ごとに特化した治療が行えない現状がある。つまり、属内で病原性や予後が異なる報告があるにも関わらず、実臨床では *Acinetobacter* 属全体をターゲットにした菌種ごとの病原性を考慮しない治療となっている可能性がある。

*Acinetobacter* 属が重症感染症である血液培養から分離された場合、経験的治療として、カルバペネム系薬が投与されることがある。しかし、*Acinetobacter* 属が臨床的に切り札的抗菌薬であるカルバペネム系薬へ耐性を示した場合、治療に難渋することは明確である。カルバペネム系薬への耐性機構は *Acinetobacter* 属の中でも異なっている。申請者の研究では、本邦における *A. baumannii* のカルバペネム系薬への耐性機構は OXA 型カルバペネマーゼによるものが主であることを報告した (J Antimicrob Chemother. 2012; 67: 1623-6.)。一方、*A. baumannii* 以外の菌種に関してはカルバペネム系薬耐性の *A. soli* (Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56: 2786-7.), *A. ursingii* (J Antimicrob Chemother. 2012; 67: 2533-4.) を世界で初めて分離し、その耐性機構が *A. baumannii* とは異なるメタロ -ラクタマーゼおよびポーリンの変異によるところが大きいことを報告してきた。このような耐性機構の違いは病原性に応じたオーダーメイド治療の確立および耐性機構に応じた新規治療薬の開発に直結する重要な知見である。

一方で、病院内における *Acinetobacter* 属感染症ではなく、市中において感染する市中感染型 *Acinetobacter* 属感染症が知られている。市中型は同じ *Acinetobacter* 属による感染症であるにも関わらず、劇症型の経過 (致死経過) を取ることが知られており、重症化率は 90% 以上、致命率は 60% 以上である

ことが報告されている (Chest. 2001; 120: 1072-7.)。従来、市中感染型 *Acinetobacter* 属感染症は亜熱帯地域での報告 (J Clin Microbiol. 2002; 40: 685-6.) が主であったが、近年の温暖化に伴い、市中感染型 *Acinetobacter* 属感染症が本邦で多発する可能性が十分に考えられる。市中感染型 *Acinetobacter* 属感染症の増加は、*Acinetobacter* 属が院内へ侵入する機会を増やすものであり、致死率の高い院内感染が起こる可能性が憂慮考される。したがって、*Acinetobacter* 属の付着性・組織侵入性を含めた病原性を菌種ごとに評価・解明することは、今後の本邦における *Acinetobacter* 属感染症の治療上重要な情報になる。

## 2. 研究の目的

*Acinetobacter* 属は臨床的に喀痰などの気道検体から分離されることが多いことから、喀痰から分離された *Acinetobacter* 属を対象とし、重症感染症を引き起こした場合の切り札的抗菌薬であるカルバペネム系抗菌薬に耐性を示した株の菌種ごとの耐性機序を解明し、オーダーメイド治療法を確立するため、また、実地臨床感染症治療に寄与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 【対象菌株】

東北大学病院において喀痰培養検査により分離され、質量分析器 (MALDI-TOF-MS) により *Acinetobacter* 属と同定された入院患者由来 52 株および外来患者由来株 8 株の計 60 株を解析対象とした。

### 【正確な菌種レベルにおける同定】

RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene (rpoB) の全 4089bp のうち、zone1 (350bp) の遺伝子解析により行った。

### 【薬剤感受性試験】

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に準拠した、寒天平板希釈

法を用いて、MIC を測定した。使用薬剤は Ampicillin, Ampicillin-sulbactam, Cefazolin, Cefotiam, Cefotaxime, Ceftazidime, Cefepime, Cefoxitin, Aztreonam, Imipenem, Meropenem, Biapenem, Doripenem, Panipenem, Ertapenem, Nalidixic acid, Levofloxacin, Amikacin, Gentamicin, Colistin, Tigecycline の計 20 薬剤とした。

【カルバペネム系抗菌薬耐性遺伝子の検出】  
OXA 型カルバペネマーゼ産生遺伝子の検出として、OXA-51-like、OXA-58-like、OXA-23-like、OXA-24-like、OXA-143-like、OXA-235-like、さらには insertion sequence (IS) の挿入を確認するため、IS<sub>Aba1</sub>、IS<sub>Aba2</sub>、IS<sub>Aba3</sub>、IS18 との関連性も検討した。MBL 産生遺伝子の検出は IMP-1、IMP-2、VIM-1,2、SIM、GIM、NDM に関して行った。外膜 porin の発現に関しては *carO* 遺伝子の有無を確認した。

【インテグロン構造の解析および Multilocus Sequence Typing (MLST)】  
MBL 産生遺伝子保有株については、プラスミド上に位置する class1 インテグロン構造解析をプライマーウォーキングにより得られた DNA シークエンスにより行った。DNA シークエンス結果に対して、BLASTn を用いて得られた塩基配列により解析を行った。さらに *A. baumannii* に関しては MLST 解析を行った。

## 4. 研究成果

菌種別の分離頻度は、*A. nosocomialis* (21.3%)、*A. soli* (18.0%)、*A. pittii* (16.4%)、*A. baumannii* (11.5%)、*Acinetobacter* gen.sp 13BJ (6.7%)、*A. calcoaceticus* (6.7%)、*A. ursingii* (3.3%) など多様な菌種が分離された。

我々の以前の研究 (課題番号: 24590675) では血液培養から分離される *Acinetobacter* 属は *A. soli* が多いことを明らかにしている。喀痰からの分離株において、*A. soli* が多い

事実は、*A. soli* の病原性つまりは組織侵入性の可能性を示唆するかもしれない。

薬剤感受性試験においてはカルバペネム系抗菌薬である Imipenem, Meropenem, Biapenem, Doripenem, Panipenem, Ertapenem のすべてのMICが 8 $\mu$ g/ml 示したのは5株あり、非感性率は8.3%であった。菌種は *A. soli* が2株、*Acinetobacter* gen. sp. 13BJ が3株であった。CL について、寒天平板希釈法では、CLSI によりブレイクポイントとして定められている MIC<sub>4</sub> $\mu$ g/ml 以上を示した株は19株、31.7%を占めた（E-test 法では、耐性を示したのは4株、耐性率は6.7%であった）。

OXA-51-like 遺伝子を保有していた株は、60株中7株あり、菌種はすべて *A. baumannii* であった。これらは、すべて IS<sub>Aba1</sub> との関連はなかった。OXA-51-like の詳細な型別では、それぞれ OXA-208、OXA-104、OXA-88、OXA-120、OXA-259、OXA-98 と様々であった。OXA-23-like を保有していた株は1株存在し、菌種は *A. radioresistens* であった。IS<sub>Aba1</sub> との関連はなかった。OXA-24-like を保有した株は認めなかったが、OXA-58-like は、*Acinetobacter* gen.sp 13BJ で1株検出された。これは、上流に IS<sub>Aba3</sub> が挿入されており、発現していることが確認された。

MBL 産生遺伝子は、IMP-1 型が5株検出された。菌種は、*A. soli* が2株、*Acinetobacter* gen.sp 13BJ が3株であった。IMP-1 型酵素は、シーケンス解析による型別の結果、すべて IMP-34 であった。

プライマーウォーキングによるシーケンス解析の結果、IMP-34 を保有する5株はすべて同一のインテグロン構造を保有していた。すなわち、耐性遺伝子としてはその最も上流に IMP-34 が位置し、同時に aacA4、OXA-1 をコードしていた。

外膜 porin をコードする遺伝子である *carO* は、63.9%で陰性となり、外膜の変異の可能性が示唆された。特にカルバペネム系薬耐性

株において（MICが 8 $\mu$ g/ml の場合）はすべて外膜の変異の可能性が示唆された。

本研究において最も注目すべき事項は、今まで分離報告が少なかった *Acinetobacter* gen.sp.13BJ が複数分離されたことである。染色体性に CL 耐性であることから、本菌が他のラクタム系薬に耐性を示すようになった場合には治療が不可能になる。また、本研究で分離された *Acinetobacter* gen.sp.13BJ のうち1株はMDRAであったことは感染症診療および感染対策に大きな警笛を鳴らすことになった。さらに本菌のラクタム系薬への耐性はIMP-34によるものであり、*Acinetobacter* 属からの分離としては本邦で初めての確認となった。本研究におけるMBL産生 *Acinetobacter* spp. の class1 インテグロン構造は、IMP-34 が最上流に位置し、ほかに aacA4、OXA-1 をコードしており、国内からの既報とは構造が異なるものであった。この事実は、耐性遺伝子に関わるインテグロン構造が、地域的に異なることを示唆するものである。したがって、地域性も考慮した治療戦略も必要になると思われた。

## 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）

〔学会発表〕(計1件)

Y. Suzuki, S. Endo, R. Nakano, K. Saito, A. Nakano, F. Mizuno, H. Yano, M. Kaku: Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. Clinical isolates from sputum specimen in Japan. 27<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 22 April 2017, Vienna (Austria)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 史郎 (ENDO, Shiro)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：40614491

### (2) 研究分担者

矢野 寿一 (YANO, Hisakazu)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号： 20374944

中野竜一 (NAKANO, Ryuichi)  
奈良県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 80433712

(3)連携研究者

(4)研究協力者

鈴木 由紀 (SUZUKI, Yuki)