

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08774

研究課題名(和文) ステルス型カルバペネム耐性菌の分子疫学的解析及び効果的検出法の確立

研究課題名(英文) Identification and Molecular characteristics of Stealth type carbapenem resistant bacteria.

研究代表者

大澤 佳代 (OSAWA, KAYO)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：50324942

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)：カルバペネム耐性細菌のなかでカルバペネマーゼ産生菌は、治療が手遅れになる可能性がある。よって、カルバペネマーゼ産生菌の疫学と分子生物学的特徴を明らかにし、早期かつ確実に検出できる方法を検討した。腸内細菌科細菌のカルバペネマーゼ遺伝子として、IMP-6型が見られ、特に大腸菌は全て世界で流行している表現型B2、Multilocus sequence typing 解析によりSequence type (ST)131であった。緑膿菌では、IMP-1型やIMP-7型が認められた。また、カルバペネマーゼの検出には、チオール化合物としてカプトプリルを用いることでIMP型などの検出に役立つことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Carbapenem-resistant bacteria, in particular, carbapenemase producing bacteria were hard to treat, because it was difficult to detect the carbapenemase producing bacteria (CPB). The purpose of the study was to determine the epidemiology of carbapenemase genes among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. Of these isolates, IMP-6 type carbapenemase producing *Escherichia coli* isolates were the global pandemic of the B2-ST131 by Multilocus sequence typing. While, carbapenemase producing *P. aeruginosa* have IMP-1 or IMP-7. Our research provides epidemiological data showing the quick spread of CPB. Moreover, we confirmed that Captopril, as a thiol compound, were used the detection of IMP in CPB.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤耐性 カルバペネマーゼ 基質特異性拡張型 ラクタマーゼ 分子疫学

1. 研究開始当初の背景

- 1) カルバペネム耐性菌について：近年、抗菌薬の不適切な使用に伴い、中でも切り札的薬剤であるカルバペネム系薬剤に耐性を示す病原菌が急速に増加してきている。カルバペネム耐性の機構として、第3・4世代セフェム系だけでなく、カルバペネム系抗菌薬をも分解してしまうβ-ラクタマーゼの一種であるカルバペネマーゼ、中でもメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)、OXA型β-ラクタマーゼ、AmpC型β-ラクタマーゼの過剰産生や薬剤排出機構が関わっている。WHOでも2014春にAntimicrobial resistance: global report on surveillance 2014としてカルバペネム耐性腸内細菌科(Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE)に対し警告を出している。本年9月、本邦でも感染症法の改正があり、カルバペネム系薬剤に対して耐性を示す腸内細菌科細菌に対して届出義務が生じている。
- 2) 世界における分離状況：近年では、腸内細菌科の大腸菌や肺炎桿菌において、カルバペネムを含む広域β-ラクタム薬を分解するMBLとしてNDM-1型やKPC型カルバペネマーゼを産生するものが多く、このような多剤耐性菌の感染事例が、アメリカ、ヨーロッパで増加しているとの報告がある。アジア地域ではIMP型MBLのほか、OXA型やKPC型も報告されている。
- 3) 日本国内における分離状況：本邦でのカルバペネマーゼはIMP型やVIM型MBLが多剤耐性緑膿菌(Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MDRP)が検出されており、CREに対する報告は非常に少ない。今年3月大阪においてCREが検出され、大規模な院内感染として報告された。このCREは通常の検査において検出困難な「ステルス型」MBL産生菌であった。ステルス型は通常の薬剤感受性試験では

カルバペネム系薬剤に対する最少発育阻止濃度として感性を示し、「治療有効」と判断できる検査結果を示すが、実際にはカルバペネム系薬剤が効かない菌である。そのため、検出しにくいだけでなく、検査結果によりカルバペネム系薬剤を治療に使い、手遅れになる可能性がある。さらに、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(Extended-spectrum β-lactamase: ESBL)の一種であり、カルバペネム耐性を獲得したESBLが検出されるなど、日本におけるこれらの耐性菌の監視は非常に重要である。このような現状を鑑み、ステルス型カルバペネム耐性菌の分子疫学的・分子生物学的解析とその迅速かつ確実な検出方法の確立は、临床上ならびに院内感染上のきわめて重要な課題となっている。

2. 研究の目的

現在、第3及び第4世代セフェム系だけでなく、イミペネムをはじめとするカルバペネム系抗菌薬が効かない細菌の出現、伝播が社会問題化されている。その耐性機構としては、カルバペネム系抗菌薬をも分解してしまうβ-ラクタマーゼの一種であるカルバペネマーゼであるメタロ-β-ラクタマーゼ、OXA型β-ラクタマーゼ、AmpC型β-ラクタマーゼなどの過剰産生や、基質拡張変異、薬剤排出システムの発現亢進などが関わっている。特に、日本において「ステルス型」と呼ばれているβ-ラクタマーゼの一種であるカルバペネマーゼ産生菌は通常の検査において検出困難なため、カルバペネム系抗菌薬を使用し、治療が手遅れになる可能性がある。よって、腸内細菌科及び緑膿菌におけるステルス型カルバペネム耐性菌の疫学と分子生物学的特徴を明らかにし、早期かつ確実に検出できる方法を探る。

3. 研究の方法

- 1) 神戸大学附属病院及びその関連施設において分離同定されたグラム陰性菌のうち、

薬剤感受性試験を行い、ステルス型カルバペネム耐性菌の確認（変法ホッジテストなどの簡易スクリーニング試験と PCR によるカルバペネマーゼ関連遺伝子確認試験）を行い、型別を実施し、ステルス型の分子生物学的特性を同定する。

- 2)ステルス型カルバペネム耐性菌について、Multilocus sequence typing (MLST) や疫学手法である rep-PCR により相同性を確認し、さらにプラスミド解析により非ステルス型との比較をし、耐性菌の伝播様式を確認する。
- 3)ステルス型カルバペネム耐性菌に対する効果的かつ迅速な検出方法を探る。

4. 研究成果

1) 腸内細菌科細菌について

1-1) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌

2011年1月から2015年7月に兵庫県および三重県で分離された肺炎桿菌18株、大腸菌23株について、14種類の抗菌薬に対する感受性試験を行い、MBL産生性を確認した。PCRおよびシーケンスを行い、カルバペネマーゼ関連遺伝子の検出を行った結果、全てIMP-6型が見られた。

1-2) カルバペネム耐性大腸菌23株についてこれらは同時ESBL遺伝子の保有があり、CTX-M-2型やCTX-M-15型産生が認められた。これらは全て世界で流行している表現型B2であり、MLST解析によりSequence type (ST)131であった。これらは疫学手法であるrep-PCRにより3系統に分かれた。このプラスミドに対してplasmid replicon typingによるIMP-6型産生株はIncNプラスミド骨格を持っており、このプラスミドに bla_{IMP-6} と $bla_{CTX-M-2}$ が存在していることを確認した。

1-3) IncNを1-16領域に分割してPCR scanningによるプラスミド解析を行った。その結果、 bla_{IMP-6} が存在する領域2および領域3は、 bla_{IMP-6} 陽性の23株全てにお

いて陽性、 $bla_{CTX-M-2}$ が存在する領域15は、 $bla_{CTX-M-2}$ 陽性の21株全てにおいて陽性であった。領域1、領域4、領域15では、サイズの異なる増幅産物が認められた。

1-4) インドネシアの小児下痢症患者から分離された大腸菌124株を対象とし、15種類の抗菌薬を用いた薬剤感受性試験及びMBLやESBL確認試験を行った。MBL産生株は認められなかったが、ESBL産生株であると確認されたのは20.2% (25/124株)であった。ESBL産生大腸菌はラクタム系抗菌薬に耐性を示すだけでなく、GM、NA、CFPXが耐性であり、ESBL非産生株と比較して、耐性の割合が高かった ($p < 0.01$)。ESBL遺伝子の型別では世界で拡散しているクローンの一つであるCTX-M-15型が84.0% (21/25株)に見られた。

2) 緑膿菌について

2-1) 兵庫県内の医療機関から分離されたカルバペネム耐性緑膿菌55株を対象とした。10種類の抗菌薬において感受性試験を行い、MBL産生性を確認した。IPM (もしくはMEPM)、CPFXおよびAMKの3種類の抗菌薬に耐性を示した株をMDRPと判定した。カルバペネム耐性緑膿菌のうち、MBL産生菌は76.4% (42/55株)を占めていた。MDRPは55株中10株であり、そのうち80.0% (8/10株)がMBL産生菌であった。MBL産生菌では、MBL非産生菌に比べCAZ ($p < 0.01$)、CFPM ($p < 0.01$)、CPFX ($p < 0.01$)、ATM ($p = 0.048$)に対する耐性の割合が高かった。一方、CLには100%感受性を示した。PCRの結果は、IMP型85.7% (36/42株)、VIM型9.5% (4/42株)であり、IMP型陽性株についてシーケンス解析を行ったところ、IMP-1型55.6% (20/36株)、IMP-7型44.4% (16/36株)となった。MDRPではIMP-1型50.0% (4/8株)、IMP-7型50.0% (4/8株)であった。IMP-1

型、IMP-7型ともに、CAZ と CFPM ($p = 0.023$)、加えてIMP-7型ではATM ($p < 0.01$) に対する耐性の割合が高いことが示された。

2-2) 緑膿菌のうち、カルバペネム耐性株 44 株と感性株 42 株における *mexB* と *oprD* の発現量および *oprD* の変異に関して比較を行った。その結果、カルバペネム耐性株および感性株の *mexB* 発現量に関してカルバペネム耐性株 44 株中 4 株に 2 倍以上の過剰発現が確認され、一部の株において薬剤排出ポンプの機能亢進が考えられた。また、カルバペネム耐性株においてのみ *oprD* 配列の変異が確認され、中でも 341ins (C) の *oprD* 発現量はカルバペネム感性株と比較して有意に低下していた ($p < 0.05$)。

3)カルバペネマーゼの検出法について

チオール基 (-SH)を持つチオール化合物が MBL の活性中心を阻害するという報告から、チオール化合物としてカプトプリルを用いた。ダブルシナジー法をもとに、薬剤ディスクの一方にのみ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにカプトプリル水溶液を含ませた。その結果、CAZ は他の薬剤に比べ IMP-1 の検出率が良く、MEPM、DRPM は IMP-6 や NDM-1 の検出率が良いことがわかった。

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)

Eddy Bagus Wasito, Katsumi Shigemura, Kayo Osawa, Alpha Fardah, Akiho Kanaida, Dadik Raharjo, K. Kuntaman, Usman Hadi, Sugeng Harijono, Subijanto Marto Sudarmo, Tatsuya Nakamura, Keigo Shibayama, Masato Fujisawa, Toshiro

Shirakawa. Antibiotic Susceptibilities and Genetic Characteristics of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Stools of Pediatric Diarrhea Patients in Surabaya, Indonesia. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70(4):378-382.

[学会発表](計 10 件)

朝比奈桃花、大澤佳代、重村克巳、吉田弘之、中村竜也、藤澤正人、荒川創一、白川利朗

兵庫県におけるカルバペネム耐性腸内細菌の分離状況

第 10 回日本臨床検査学教育学会学術大会
2015 年 8 月 19 日 - 2015 年 8 月 21 日
信州大学医学部地域保健推進センター他
(長野県松本市)

高坂綾香、大澤佳代、重村克巳、山道深、吉田弘之、中村竜也、藤澤正人、荒川創一、白川利朗

兵庫県内で分離されたメタロ β ラクタマーゼ産生緑膿菌の解析

第 10 回日本臨床検査学教育学会学術大会
2015 年 8 月 19 日 - 2015 年 8 月 21 日
信州大学医学部地域保健推進センター他
(長野県松本市)

金井田陽保、大澤佳代、重村克巳、Raharjo Dadik、白川利朗

インドネシアで分離された ESBL 産生 *Escherichia coli* の動向調査

第 10 回日本臨床検査学教育学会学術大会
2015 年 8 月 19 日 - 2015 年 8 月 21 日
信州大学医学部地域保健推進センター他
(長野県松本市)

高坂綾香、大澤佳代、重村克巳、山道深、吉田弘之、中村竜也、藤澤正人、荒川創一、白川利朗

兵庫県内で分離されたメタロ β ラクタマーゼ産生緑膿菌の解析学会等名

第 58 回日本感染症学会中日本地方会学術

集会

2015年10月15日 - 2015年10月17日

奈良春日野国際フォーラム 麓~I・RA・KA
~ (旧: 奈良県新公会堂) 奈良ホテル (奈良県奈良市)

Katsumi Shigemura, Kayo Osawa, Kazushi Tanaka, Yuzo Nakano, Toshiro Shirakawa, Soichi Arakawa, Masato Fujisawa

Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated urinary tract infection in a university teaching hospital

AUA Annual Meeting 2016

2016年5月6日 - 2016年5月10日

San Diego Convention Center (San Diego, USA)

朝比奈桃花、大澤佳代、重村克巳、吉田弘之、藤澤正人、荒川創一

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分離状況

第64回日本化学療法学会総会

2016年6月9日 - 2016年6月11日

神戸国際会議場 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)

Akiho Kanaida, Kayo Osawa, Katsumi Shigemura, Alpha Fardah, Dadik Raharjo, Eddy Bagus Wasito, Sugeng Harijono, Subijanto Marto Sudarmo, Toshiro Shirakawa
Dissemination of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in Indonesia

第32回世界医学検査学会

2016年8月31日 - 2016年9月4日

神戸国際会議場 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)

佐藤加奈子、大澤佳代、重村克巳、中村竜也、時松一成、白川利朗

兵庫県内で分離された *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤耐性機構の解析

第12回日本臨床検査学教育学会学術大会

2017年8月23日 - 2017年8月25日

埼玉県立大学 (埼玉県越谷市)

Noriko Nakanishi, Ryohei Nomoto, Kanako Sato, Chihiro Koike, Mari Kusuki, Tatsuya Nakamura, Katsumi Shigemura, Toshiro Shirakawa, Issei Tokimatsu

Analysis of antimicrobial resistance mechanism in successive infections of *Pseudomonas aeruginosa*

第91回日本細菌学会総会

2018年3月27日 - 2018年3月29日

福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

佐藤加奈子、大澤佳代、重村克巳、楠木まり、中村竜也、時松一成、藤澤正人
カルバペネム耐性緑膿菌の薬剤耐性機構の解析

第66回日本化学療法学会総会

2018年5月31日 - 2018年6月2日

岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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

大澤 佳代 (OSAWA, Kayo)

神戸大学大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：50324942

(2)研究分担者

重村 克巳 (SHIGEMURA Katsumi)

神戸大学大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：00457102

(2)研究分担者

荒川 創一 (ARAKAWA Soichi)

神戸大学大学院医学研究科・客員教授

研究者番号：70159490

(2)研究分担者

白川 利朗 (SHIRAKAWA Toshiro)

神戸大学大学院科学技術イノベーション

研究科・教授

研究者番号：70335446

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()