

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07120

研究課題名(和文) アミノグリコシド高度耐性アシネトバクター属菌特有の染色体インテグレート機構

研究課題名(英文) Mechanisms of chromosomal integration in highly aminoglycoside-resistant Acinetobacter species

研究代表者

多田 達哉 (Tada, Tatsuya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00624644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高度多剤耐性アシネトバクター属菌が日本や東南アジアの医療施設で新興し、感染症治療および院内感染対策上の大きな脅威となっている。本研究の結果、多剤耐性アシネトバクター属菌のプロファージに關与する遺伝子が16S rRNAメチラーゼ遺伝子及びカルバペネム耐性遺伝子をアシネトバクターの染色体にインテグレートさせて高度耐性化していることが分かった。アシネトバクターや緑膿菌は薬剤耐性化しやすいが、成育環境によってはプラスミドではなく、染色体に薬剤耐性因子を保有することで生き残る確率を上げていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度多剤耐性アシネトバクター属菌が日本や東南アジアの医療施設で新興し、感染症治療および院内感染対策上の大きな脅威となっている。これらの国々で分離される多くのアシネトバクター属菌はアミノグリコシド系薬に対して高度耐性を付与する16S rRNAメチラーゼを産生していること、その分離頻度が2012年から2015年にかけて優位に増加していることを明らかにしてきた。このような高度耐性菌の薬剤耐性化機構の解明は薬剤耐性菌の治療薬開発の一助となることから、学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Highly multidrug-resistant Acinetobacter species have emerged in medical facilities in Japan and Southeast Asia, and pose a major threat to infectious disease treatment and nosocomial infection control. As a result of this study, it was found that the prophage of multidrug-resistant Acinetobacter species contributed to integrate the 16S rRNA methylase genes and the carbapenem resistance genes into Acinetobacter chromosome and made them highly resistant to aminoglycosides and carbapenems. It was suggested that Acinetobacter species increase the probability of survival to carry drug-resistant factors on the chromosome instead of plasmids on the growth environments.

研究分野：細菌学

キーワード：アシネトバクター アミノグリコシド 染色体 インテグレート機構

## 1. 研究開始当初の背景

種々の薬剤耐性菌が医療施設を中心に新興し、それが地球規模で拡大している(Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014: WHO)。この薬剤耐性菌の新興は世界の医療安全を根底から脅かすようになってきた。多剤耐性アシネトバクター属菌(MDRA)は、ラクタム系薬、アミノグリコシド系薬およびフルオロキノロン系薬の3剤すべてに耐性を示す。2003年のイラク戦争直後より、MDRAによるヨーロッパやアメリカ本土の米軍医療施設内アウトブレイクが多数発生し、中央・中東アジアで負傷した兵士によって欧米に伝播されたと考えられている。MDRAは中国、韓国、ベトナム、タイ、ネパールなどのアジア諸国の医療施設で高頻度に分離されることが多数報告されている。MDRAの我が国における分離報告は同じブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌である多剤耐性緑膿菌と比較すると稀であるが、申請者の研究から、アミノグリコシドに対する最小発育阻止濃度が1,024 µg/mlを超えるアミノグリコシド高度耐性MDRAが日本国内で新興し、伝播拡大しつつあることが明らかとなった。これらのMDRAはすべてアミノグリコシド高度耐性を付与する16S rRNAメチラーゼ産生菌であった。完全長ゲノム解析から日本を含むアジア諸国で流行している16S rRNAメチラーゼ産生MDRA流行株は特定の遺伝子背景を持ったストレインが、様々な薬剤耐性因子を染色体にインテグレートしアミノグリコシド系薬やカルバペネム系に対して高度耐性を獲得していることが分かった。しかし、どのようなメカニズムで外来の薬剤耐性因子を染色体にインテグレートしているのかは分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の学術的独自性と独創的な点は日本、ベトナムおよびネパールといったアジア諸国から分離された臨床分離株を用いること、完全長ゲノムを用いた詳細な比較ゲノム解析が可能であること、アジア諸国の流行性多剤耐性アシネトバクター属菌の特徴を分子レベルで解明することである。申請者は日本およびアジア諸国で分離された1200株の多剤耐性アシネトバクター属菌を収集し、詳細な比較ゲノム解析を行ってきた。また、申請者は2013年から沖縄総合科学研究所(現・株式会社 先端医療開発)との共同研究を実施しており、MDRAの完全長ゲノムを得ることができる。本研究の目的はアジア諸国で分離された多剤耐性アシネトバクター属菌特有の外来薬剤耐性遺伝子インテグレート機構を解明することである。

## 3. 研究の方法

高度多剤耐性アシネトバクター属菌固有に持っているインテグレーション関連遺伝子の特定: 本研究では日本およびアジア諸国で分離された多剤耐性アシネトバクター・バウマニー臨床分離株を用いる。アシネトバクター・バウマニーはアシネトバクター属の中でも特に高度耐性化しやすく、日本における海外輸入事例が問題となっている。予備的解析において完全長ゲノムを明らかにしたアミノグリコシド高度耐性MDRA3株(日本由来1株、ベトナム由来1株、ネパール由来1株)および感受性株1株との比較解析から、アミノグリコシド高度耐性MDRAが特異的に保有している25遺伝子のORFをスクリーニングした。さらにそこから病原性、鞭毛・繊毛形成およびバイオフィルム形成に関与するORFを除いた結果、12遺伝子(OrfA~OrfL)に絞り込んだ。完全長ゲノム決定した3株のアミノグリコシド高度耐性MDRAおよび次世代シーケンサMiSeqで全ゲノム配列を決定しているアミノグリコシド高度耐性MDRA250株(日本50株、ベ

トナム 100 株およびネパール 100 株)の配列情報を用いて、完全長ゲノムがわかっている感受性臨床分離株および環境由来株と比較し、アミノグリコシド高度耐性 MDRA に固有に持っている遺伝子(群)を特定する。

同定した遺伝子の機能解析: 感受性アシネトバクター・バウマニー実験株をベースにシャトルベクター 1 に候補遺伝子を、シャトルベクター 2 にはトランスポゼース領域を両端に付加したアミノグリコシド高度耐性遺伝子 armA をそれぞれ発現させる。ベクター 1 および 2 を薬剤感受性アシネトバクター・バウマニー株に発現させ、継代培養を行う。外来遺伝子獲得能力の変化やトランスポジションの発生については世代時間を考慮した次世代シーケンサによる全ゲノムレベル網羅的変異頻度解析により定量化する。

#### 4 . 研究成果

本研究の結果、アルベカシン(アミノグリコシド系薬の 1 種)高度耐性を付与する遺伝子 16S rRNA メチラーゼ遺伝子 armA を含むプラスミドを導入させた MDRA を試験管内でアルベカシン存在下で 149 回継代した結果、armA 遺伝子が染色体ゲノムにインテグレートされていた。比較ゲノム解析の結果から得られた候補遺伝子をシャトルベクターに組み込み、感受性アシネトバクター・バウマニー実験株をベースに発現させ、継代培養を行ったところ、プロファージをコードする遺伝子で染色体に armA がインテグレートされ、感受性株がアミノグリコシド耐性となった。このことから、多剤耐性アシネトバクター属菌のプロファージに関与する遺伝子が 16S rRNA メチラーゼ遺伝子及びカルバペネム耐性遺伝子をアシネトバクターの染色体にインテグレートさせて高度耐性化していることが分かった。アシネトバクターや緑膿菌は薬剤耐性化しやすいが、成育環境によってはプラスミドではなく、染色体に薬剤耐性因子を保有することで生き残る確率を上げていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tada Tatsuya, Uchida Hiroki, Hishinuma Tomomi, Watanabe Shin, Tohya Mari, Kuwahara-Arai Kyoko, Mya San, Zan Khin Nyein, Kirikae Teruo, Tin Htay Htay	4. 巻 22
2. 論文標題 Molecular epidemiology of multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> isolates from hospitals in Myanmar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 122 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tada Tatsuya, Sekiguchi Jun-ichiro, Watanabe Shin, Kuwahara-Arai Kyoko, Mizutani Naeko, Yanagisawa Izumi, Hishinuma Tomomi, Zan Khin Nyein, Mya San, Tin Htay Htay, Kirikae Teruo	4. 巻 19
2. 論文標題 Assessment of a newly developed immunochromatographic assay for NDM-type metallo-β-lactamase producing Gram-negative pathogens in Myanmar	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-019-4147-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Uechi Kohei, Tada Tatsuya, Kuwahara-Arai Kyoko, Sekiguchi Jun-ichiro, Yanagisawa Izumi, Tome Takaaki, Nakasone Isamu, Maeda Shiro, Mya San, Zan Khin Nyein, Tin Htay Htay, Kirikae Teruo, Fujita Jiro	4. 巻 68
2. 論文標題 An improved carbapenem inactivation method, CIMTrisII, for carbapenemase production by Gram-negative pathogens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 124 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.000888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hishinuma Tomomi, Tada Tatsuya, Kuwahara-Arai Kyoko, Yamamoto Norio, Shimojima Masahiro, Kirikae Teruo	4. 巻 13
2. 論文標題 Spread of GES-5 carbapenemase-producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinical isolates in Japan due to clonal expansion of ST235	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0207134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0207134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Uechi Kohei, Tohya Mari, Tada Tatsuya, Tome Takaaki, Takahashi Ami, Kinjo Takeshi, Maeda Shiro, Kirikae Teruo, Fujita Jiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Emergence of a multidrug-resistant plasmid encoding blaNDM-1, blaOXA-420 and armA in a clinical isolate of Acinetobacter variabilis in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.001395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------