

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08429

研究課題名(和文)カルバペネム低感受性緑色レンサ球菌のカルバペネム低感受性機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of reduced carbapenem susceptibility mechanisms of viridans streptococcus

研究代表者

木村 幸司 (Kimura, Kouji)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50425675

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)：カルバペネム低感受性*S. mitis/oralis*は、カルバペネム系薬の標的分子PBP遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基置換を複数獲得していることを明らかにした。興味深いことに、それらのアミノ酸置換のうち、PBPのトランスペプチダーゼドメインにある、 β -ラクタム系薬が結合すると予想される、活性中心を形成する保存領域にアミノ酸置換を有する株も認められた。また、変異PBP遺伝子を*S. mitis/oralis*標準株へ導入することにより、 β -ラクタム系薬の最小発育阻止濃度が上昇したことから、PBP遺伝子の変異が β -ラクタム系薬低感受性を付与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、*S. mitis/oralis*において、切り札であるカルバペネム耐性が進行していることを臨床現場に警鐘を鳴らすとともに、34菌種ほどあると言われていた緑色レンサ球菌並びにレンサ球菌群のカルバペネム耐性に関する研究が進展するものと予想される。*S. mitis/oralis*のみならず、緑色レンサ球菌並びにレンサ球菌群について、 β -ラクタム系薬に対する薬剤感受性が検討されることが予想され、本研究成果は、世界に先駆けたものになると考えられる。これらの研究を通して、医療現場に必要な情報が提供され、また、臨床研究も進められ、薬剤耐性菌対策に必要な知見が蓄積されていくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that carbapenem non-susceptible *S. mitis / oralis* has acquired multiple base substitutions with amino acid substitutions in the target molecule of carbapenem drugs, PBP genes. Interestingly, among those amino acid substitutions, some strains have amino acid substitutions in the conservative region of the transpeptidase domain of PBPs that forms the active site, where β -lactam antibiotics are expected to bind. In addition, the introduction of the mutant PBP gene into the *S. mitis / oralis* standard strain increased the minimum inhibitory concentration of β -lactams, and thus It became clear that the mutation of the PBP gene confer to reduced β -lactams susceptibility.

研究分野：細菌学、感染症学

キーワード：薬剤耐性菌 緑色レンサ球菌 β -ラクタム系薬 PBP

1. 研究開始当初の背景

2014年にWHO(World Health Organization)、米国大統領、英国首相が、それぞれ薬剤耐性微生物に対する対策の策定を指示するなど、薬剤耐性菌の問題は、世界的な大きな問題である。緑色レンサ球菌群に含まれる *Streptococcus mitis* と *Streptococcus oralis* (*S. mitis/oralis*) は、ヒト口腔等から分離されることのある常在性の高い菌種ではあるが、抜歯などを契機に菌血症、心内膜炎を健常人に引き起こすことがある。また、日和見感染症の原因菌としても知られており、敗血症等を引き起こす。

かつては、すべての臨床分離される *S. mitis/oralis* は、ペニシリン系薬を含むβ-ラクタム系薬(図1)に感性であったが、近年、β-ラクタム系薬の標的分子、ペニシリン結合タンパク(Penicillin-binding protein, PBP)のアミノ酸置換を

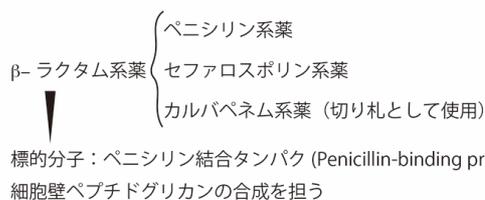


図1 β-ラクタム系薬解説

獲得したペニシリン系薬耐性、セファロスポリン系薬耐性株の増加が世界的に問題になってきている。また、これらの株は、肺炎の主要な原因菌である類縁菌種の *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) に変異 PBP 遺伝子を引き渡し、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) が出現したと考えられており、*S. mitis/oralis* は、肺炎球菌の耐性遺伝子のリザーバーと考えられている (Mol Microbiol 97(5):866-80.2015, Future Microbiol 7(3):395-410. 2012)。

研究代表者は、これまでの研究の過程を通じて、肺炎球菌において、カルバペネム耐性株は稀であることに気がついた。そこで、肺炎球菌の耐性遺伝子のリザーバーである *S. mitis/oralis* の近年のカルバペネム系薬感受性を予備実験により検討したところ、臨床分離 *S. mitis/oralis* の 17.6% (25 株/142 株中) がカルバペネム低感受性であることを見出し、近年、*S. mitis/oralis* において切り札であるカルバペネム系薬の耐性化が進んでいることを見出した。

本研究課題では、「これらのカルバペネム低感受性 *S. mitis/oralis* のカルバペネム低感受性は、どのような機構によってもたらされているのか？」という「問い」に答えるべく実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、カルバペネム低感受性 *S. mitis/oralis* のカルバペネム低感受性をもたらす機構を明らかにし、臨床現場に *S. mitis/oralis* においてカルバペネム耐性化が進んでいると警鐘を鳴らすことである。

3. 研究の方法

次世代シーケンサーを用い、カルバペネム低感受性 *S. mitis/oralis* のゲノムを解析した。特に PBP 遺伝子に着目し、重点的に解析した。さらに *S. mitis/oralis* が、自然形質転換能を有することを利用し、*S. mitis/oralis* 標準株への変異 PBP 遺伝子の導入を行った。

4 . 研究成果

カルバペネム低感受性 *S. mitis/oralis* は、カルバペネム系薬の標的分子 PBP 遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基置換を複数獲得していることを明らかにした。興味深いことに、それらのアミノ酸置換のうち、PBP のトランスペプチダーゼドメインにある、 β -ラクタム系薬が結合すると予想される、活性中心を形成する保存領域にアミノ酸置換を有する株も認められた。

また、変異 PBP 遺伝子を *S. mitis/oralis* 標準株へ導入することにより、 β -ラクタム系薬の最小発育阻止濃度が上昇したことから、PBP 遺伝子の変異が β -ラクタム系薬低感受性を付与することが明らかになった。

研究代表者は、これまでに B 群レンサ球菌 (*Streptococcus agalactiae*, Group B *Streptococcus*, GBS) において、PBP2X にアミノ酸変異を獲得することでペニシリン低感受性となることを世界で初めて明らかにし、ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌 (Group B streptococci with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) の存在を確定させた (日本化学療法学会第 20 回上田泰記念感染症・化学療法研究奨励賞、第 13 回日本抗生物質学術協議会奨励賞、平成 26 年日本細菌学会黒屋奨学賞受賞)。さらに、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) において、PBP3 が挿入変異を獲得することでカルバペネム低感受性となること (K. Kitaoka, K. Kimura, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62(8):e00671-18. 2018) などを明らかにして、PBP に関する知識の獲得、実験系の構築を行ってきた。本研究により、研究代表者のこれまでの PBP 研究をさらに発展させ、緑色レンサ球菌群で初めてのカルバペネム低感受性機構の解明を報告予定である。

本研究の成果により、*S. mitis/oralis* において、切り札であるカルバペネム耐性が進行していることを臨床現場に警鐘を鳴らすとともに、34 菌種ほどあると言われていた緑色レンサ球菌並びにレンサ球菌群のカルバペネム耐性に関する研究が進展するものと予想される。これまでも研究代表者の研究が契機になり、B 群レンサ球菌である *Streptococcus agalactiae* と遺伝情報上、近い関係にある *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) や *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*, GAS) において、PBPs にアミノ酸置換を獲得し、 β -ラクタム系薬の最小発育阻止濃度が上昇した株が、デンマーク、アメリカ、アイスランドから報告されている。(Fuursted K, et al. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(12):3376-3380. Vannice KS, Ricaldi J, Nanduri S et al. *Clin Infect Dis* 2020; 71: 201-4. Musser JM, Beres SB, Zhu L et al. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e01993-19. Southon SB, Beres SB, Kachroo P et al. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00638-20.) 本研究も、本研究成果を発表後、*S. mitis/oralis* のみならず、緑色レンサ球菌並びにレンサ球菌群について、 β -ラクタム系薬に対する薬剤感受性が検討されることが予想され、本研究成果は、世界に先駆けたものになると考えられる。これらの研究を通して、医療現場に必要な情報が提供され、また、臨床研究も進められ、薬剤耐性菌対策に必要な知見が蓄積されていくと考えられる。本研究は、日本の薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020 の 6 分野 (図 2) に当てはめるとするならば、5 番の研究開発・創薬に含まれると考えられるが、それだけにとどまらず、2 番の動向調査・監視、4 番の抗微生物剤の適正使用に必要な情報にも繋がる成果であり、薬剤耐性対策に資する基礎的研究成果であると考えられる。

図2 日本の「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン 2016-2020」の6分野



< 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020 より >

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------