

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07815

研究課題名(和文) 地域における薬剤耐性克服を目指したワンヘルスアプローチによる耐性菌の分子疫学解析

研究課題名(英文) A molecular epidemiological study of antimicrobial resistance in bacteria isolated in a prefectural area by using a One Health approach

研究代表者

川口 辰哉 (Kawaguchi, Tatsuya)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：50244116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、熊本県感染管理ネットワークの協力を得て、地域における薬剤耐性菌の分子疫学的特徴をワンヘルスアプローチにより明らかにすることを目的とした。まずMRSAは、市中感染型が増加傾向であり、その背景に特定遺伝子株(POT1値106型)の感染拡大の可能性があると判明した。一方、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌は低分離率(1%未満)のまま推移したが、その約1/4はカルバペネマーゼを有していた。一方、家禽からはESBL産生大腸菌(主にCTX-M型)が約40%程度検出され、その検出率は養鶏場間で差があることが判明した。今後はヒト由来株との関連を明らかにする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗微生物薬耐性(antimicrobial resistance :AMR)は依然として公衆衛生上の脅威であり、本邦のAMRアクションプランでは地域での感染対策への取り組みが求められている。本研究は、県下の主要施設が参加する地域の感染ネットワークが独自に構築した微生物サーベイランスシステムを駆使しており、その分析に加え分子疫学解析を試みることで、より詳細な地域における耐性菌動向を明らかにすることができた。さらに家禽におけるESBL産生大腸菌の浸淫状況も明らかとなった。これらの成果は、地域レベルでのワンヘルスアプローチによるAMR対策の具体化に有益な情報をもたらすものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial resistance (AMR) has become a global health threat. The national action plan on AMR encourages implementation of regional infection control measures based on a network system. The aim of this study is to clarify the molecular epidemiological features of antimicrobial resistant bacteria in the Kumamoto area under the cooperation of Kumamoto Healthcare-associated Infection Prevention and Control Network. First, there was the trend toward an increase in community-acquired MRSA with the dominant clones with the POT1-106 genotype. Second, low isolation rates (<1%) lasted during the period of survey on carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE), and a quarter of CRE isolates examined so far harbored carbapenemases. Finally, we found that locally-grown poultry carried ESBL-producing E.coli (dominance of CTX-M type) at varying levels (average, 40%) depend on individual farms. These results would support our one-health approach for regional infection prevention and control.

研究分野：内科学、感染制御

キーワード：薬剤耐性菌 ワンヘルス 感染制御 地域ネットワーク

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 抗微生物薬耐性(antimicrobial resistance: AMR)は現代医療の大きな脅威であり、医療のみならず畜産や農林水産の分野において、いわゆるワンヘルスアプローチによる AMR 対策が求められている。2016 年に策定された本邦の AMR 対策アクションプランではアウトカム評価が強調され、その指標となる耐性菌の動向把握がこれまで以上に重要な意味を持つようになった。
- (2) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、今でも臨床分離の耐性菌として最多であり、接触感染で伝播することから感染防止対策の最適な評価指標でもある。一方、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)は、米国では緊急性の高い脅威とされるが(Antibiotic Resistance Threats Report, CDC 2013)、本邦での分離率は極めて低く(0.83%, 2017 年 JANIS)、その拡大にカルバペネム系抗菌薬の選択圧が重要であることを考慮すると、抗菌薬適正使用の評価に有用な指標と言える。従って、両菌に着目することは、感染制御学的な視点からも理にかなっていると考えられる。
- (3) 我々は、地域の医療機関が連携して熊本県感染管理ネットワークを組織し、独自の微生物サーベイランスシステムを構築して地域の耐性菌動向を把握してきたが、MRSA の臨床分離率が期待通り改善せず、一方で、これまで稀なカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)がしばしば検出されるなど、地域における新たな感染制御上の問題に直面している。

### 2. 研究の目的

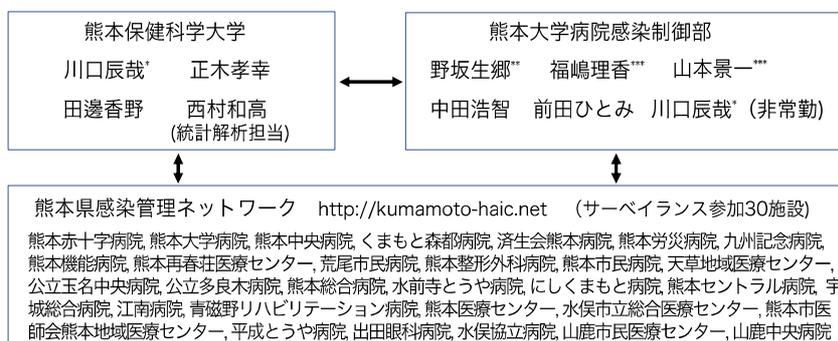
本研究は、MRSA と CRE に焦点を絞り、地域感染ネットワークに参加している 30 施設から臨床分離株を収集し、それぞれの耐性菌の代表的な薬剤耐性遺伝子のタイピングを行うことで、地域における分子疫学的な特徴を明らかにすることを目的とする。さらに同時期に家畜から分離した耐性菌の遺伝子型との比較を行い、市中での感染経路(家畜の関与)の推定を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究組織

熊本保健科学大学医学検査学科および熊本大学病院感染制御部に所属するメンバーを研究協力者として研究チームを組織した(下図)。研究代表者(川口)は、熊本大学病院の客員教授・非常勤講師であり、両施設での研究遂行に支障のない立場である。

研究組織図



\* 研究代表者 \*\* 研究分担者 \*\*\* 微生物臨床検査技師

## (2) MRSA の耐性遺伝子解析

MRSA の菌株識別には Phage ORF typing (POT) 法 (Cica Geneus Staph POT Kit, 関東化学) を用い、POT 値による MRSA クローンの推定を行なった<sup>1)</sup>。さらに確実に community acquired (CA)-MRSA を判定するために、PCR によるメチシリン耐性遺伝子染色体カセット (SCC*mec*) 遺伝子のタイピングや<sup>2)</sup>、PVL 毒素遺伝子の検出を試みた<sup>3)</sup>。

## (3) CRE の耐性遺伝子解析

CRE 関連の耐性遺伝子として、カルバペネマーゼ (KPC、IMP-1、IMP-2、VIM-1、VIM-2、NDM、OXA-23、OXA-48、GES)、AmpC-β-ラクタマーゼ (ACC、FOX、MOX、DHA、CIT、EBC)、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) (CTX-M1 group、CTX-M2 group、CTX-M9 group) を標的とし、Multiplex-PCR 法によりこれらの検出を試みた<sup>4)</sup>。また、Modified Carbapenemase Inactivation Method (mCIM) を用いたカルバペネマーゼ産生能を確認した<sup>5)</sup>。

## (4) 臨床分離菌株の収集・保存

熊本県感染管理ネットワーク参加施設で分離された菌株は、感染性検体の輸送に関する国連規格に適合する輸送用容器、吸収材、クッション材を使用の上、3重包装をして保存施設(熊本大学病院)へ運搬した。

## (5) 動物からの耐性菌分離

熊本県食肉衛生検査所の協力により、家畜 (ブロイラー鶏、豚など) の解体直後の腸管等から綿棒で検体を採取し、直接、耐性菌の分離培地に塗布した (MRSA スクリーン寒天培地, 日本 BD; クロモアガー mSuper CARBA, 関東化学)。得られたコロニーは、直接あるいは増菌し、上記の耐性遺伝子解析を実施した。

## (6) 熊本県感染管理ネットワークの運営・管理

本研究の基盤となるネットワークホームページや微生物サーベイランスシステムの維持管理は熊本大学病院感染制御部(野坂、前田、山本)で行なった。

# 4. 研究成果

## (1) MRSA の分子疫学解析

先行して単施設(熊大病院)で 2016 年 1 月～2018 年 12 月に分離・保存された MRSA682 株を解析対象とした。POT 解析では、POT1 値 106 (以下、106)を含む POT 型が最も多く検出され(51.5%)、POT1 値 93 (以下、93) の POT 型が次に多く検出された (15.8%)。年次推移をみると、106 タイプは 2016 年の 44.2%から 2018 年には 56.7%へと有意に増加し ( $p<0.01$ )、逆に 93 タイプは 2016 年の 23.7%から 2018 年には 7.9%へと有意に減少していた ( $p<0.01$ ) (図 1)。

POT1 値から推定された SCC*mec* 型 (106 は I、93 は II) も、同様の動向が確認できた。SCC*mec* 型は市中感染型 MRSA (CA-MRSA)、II は院内感染型 MRSA (HA-MRSA) に対応しており、院内検出の MRSA は CA-MRSA が優位であることが明らかとなった。当院では、かつて流行していた HA-MRSA から CA-MRSA へ急速なクローンシフトが起こりつつあり、その原因として 106 タイプ (SCC*mec*IV) の増加と 93 タイプ (同 II)

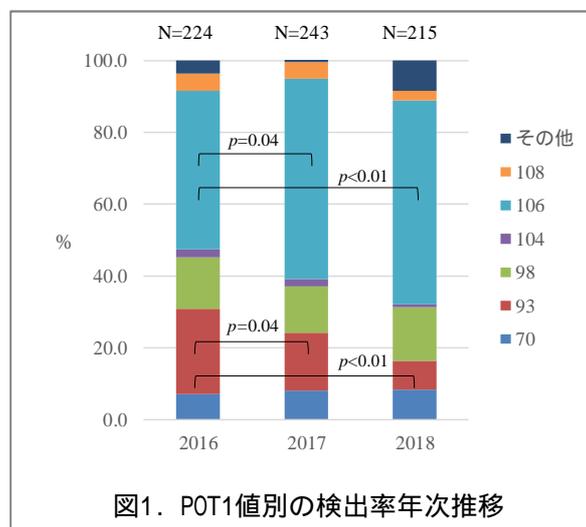


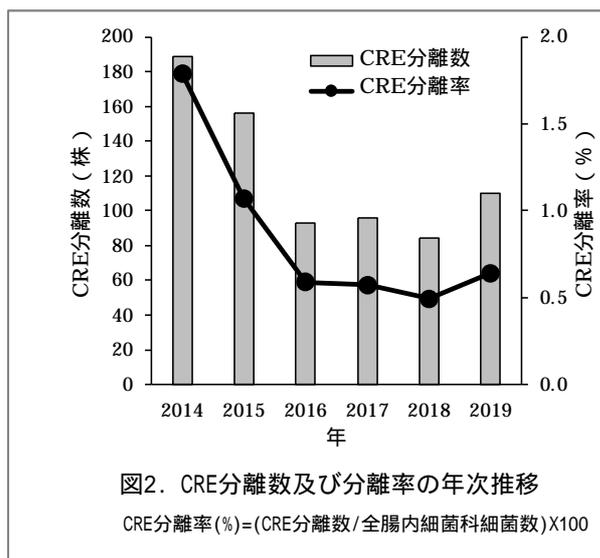
図1. POT1値別の検出率年次推移

の減少によることが明らかとなった。この結果から、院内の黄色ブドウ球菌に占める MRSA の割合が改善しない理由として、院内感染対策の充実により HA-MRSA が減少する一方で、市中からの CA-MRSA 持ち込みが減少しないためであることが示唆された。今後は、遅れていた多施設における同様の解析を進め、単施設で得られた結論と一致するかどうか検討を加える予定である。

## (2) CRE の分子疫学解析

まず微生物サーベイランスシステムのデータベースから抽出した 2014 年から 2019 年までの 6 年間の腸内細菌科細菌 91,698 株のデータを用いて分離動向を分析したところ、抗菌薬感受性試験の結果から全体のうち 728 株 (0.8%)

が CRE であり、その年次分離率は 2016 年まで減少し、その後は増加を認めなかった(図 2)。入院患者からの分離が 8 割と多く、菌種は *Enterobacter cloacae* と *Klebsiella aerogenes* で 60% を占めていた。検体の約半数は痰や尿で、糞便が増加傾向を認めた。さらに、ネットワーク参加施設から供与された CRE 82 株に対して -ラクタマーゼの遺伝子型を PCR で解析したところ、46 株 (56.1%) から -ラクタマーゼ遺伝子が検出され、そのうち 21 株 (25.6%) はカルバペナーゼであった。酵素産生能確認試験では、40 株 (48.8%) が陽性であり、そのうち 19 株 (23.1%) がカルバペナーゼと確認できた。



幸いにも CRE 分離率の増加は認めず、全国の傾向と一致していた。その要因として、全国的な AMR 対策の浸透が挙げられるが、*Klebsiella pneumoniae* の meropenem 耐性率がやや高い傾向を示したことや、約 1/4 の CRE 菌株にカルバペナーゼ遺伝子が認められたことは地域の特徴として注意が必要である。また、必ずしもカルバペナーゼの遺伝子型と表現型の解析結果が一致しなかったことから、表現型のみでは CRE を見逃す可能性があり遺伝子解析による確認が必要である。このように、CRE 分離率がたとえ低くても、容易に伝搬しうるプラスミド型の薬剤耐性遺伝子であるカルバペナーゼ遺伝子を保有する腸内細菌科細菌が一定数検出されたことから、引き続き CRE と薬剤耐性因子の疫学的監視が求められる。

## (3) 食鳥からの耐性菌分離と耐性遺伝子解析

家畜として検体が得やすい食鳥を選択し、熊本県内の食肉衛生検査所の協力により検体を収集することになった。食鳥からの耐性菌分離や耐性遺伝子解析は、研究協力者の熊本保健科学大学正木孝幸教授が担当した。検体は、採取時の細菌汚染をできるだけ防ぐために盲腸便を用いた。当初は、本研究で着目していた MRSA や CRE の検出を試みたが、これら耐性菌は検出されなかった。しかし、ESBL 産生菌が検出されたことから、ヒトでも問題となっている本菌に焦点を絞り研究を進めることになった。

食肉衛生検査所に搬入された県内外 6 養鶏場で育成された食鳥の盲腸便 250 検体から ESBL 産生菌の分離を試みたところ、97 株 (38.8%) が検出され、全て大腸菌であった。ESBL 遺伝子型

は主に CTX-M 型であったが、養鶏場毎の遺伝子型は異なっていた。興味深いことに POT 法による菌株識別の結果、同じ養鶏場内で特徴的な POT 型が存在することが明らかになった。

以上の結果から、対象地域の食鳥には養鶏場により様々なレベルで ESBL 産生大腸菌が保菌されていることが明らかとなった。養鶏場間による特定クローンの拡散はないものの、同じ養鶏場内には独立したクローンの集積が認められた。これは養鶏場毎に固有の大腸菌が存在し、同一の薬剤耐性プラスミドが保有・伝播されていることが示唆された。今後は、食鳥からヒトへの伝搬の可能性について以前から指摘されていることから、ヒト由来の ESBL 大腸菌と比較検討を行なう予定である。

#### (4) 最後に

本研究は、地域感染ネットワークが独自に構築した微生物サーベイランスシステムをプラットフォームとして、標的となる耐性菌の遺伝子解析を加えることで、より詳細な地域での検出動向を明らかにすることができたことから、地域での AMR 対策の具体化に有益な情報を提供できる点で社会的意義を有すると考えている。MRSA に関しては、その検出率がなかなか改善しない理由の一つとして、市中感染型が増加しているためであることが明らかとなり、その増加の場所がどこであるのか、新たな疑問が生じており、その解決をはかりたい。CRE の分離機会は少ないが、我々の地域でも約 1/4 にカルバペネマーゼ産生菌が検出されたことから、そのモニタリングの必要性を地域に啓発したいと考えている。ESBL 大腸菌に関しては、人獣共通の耐性菌として、あらためて地域で認識されたことから、ヒトとの比較検討など新たな課題について研究を進めていきたい。

#### (文献)

- Suzuki M, J Appl Microbiol 2006, 101:938-47.
- Kondo Y, Antimicrob Agents Chemother. 2007, 51:264-74.
- McClure J, J Clin Microbiol 2006, 44:1141-4.
- Dallenne C, J Antimicrob Chemother 2010, 65:490-5.
- van der Zwaluw K, et al. PLoS One 2015, 10 (3): e0123690.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本景一, 前田ひとみ, 林 秀幸, 澤 智裕, 川口辰哉.
2. 発表標題 当院で分離されたMRSAのPOT法による分子疫学解析-第3報-
3. 学会等名 第92回日本感染症学会西日本地方会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水田加奈子, 山本景一, 福嶋理香, 横山俊朗, 松井啓隆, 川口辰哉, 松岡雅雄.
2. 発表標題 当院におけるPVL遺伝子保有MRSAの分離状況とPOT型の関連性について
3. 学会等名 第52回熊本県医学検査学会
4. 発表年 2020年

〔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
研究 分 担 者	野坂 生郷  (Nosaka Kisato)  (90398199)	熊本大学・病院・教授    (17401)	

	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
研究 協 力 者	山本 景一  (Yamamoto Keiichi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	福島 理香  (Fukushima Rika)		
研究協力者	正木 孝幸  (Masaki Takayuki)		
研究協力者	前田 ひとみ  (Maeda Hitomi)		
研究協力者	中田 浩智  (Nakata Hiroto)		
研究協力者	田邊 香野  (Tanabe Kano)		
研究協力者	西村 和高  (Nishimura Kazutaka)		

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
---------	---------