

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10401

研究課題名（和文）本邦のリネゾリド耐性グラム陽性球菌における新規耐性機序に関する分子疫学的解析

研究課題名（英文）Molecular epidemiological study of Gram-positive cocci in Japan regarding novel resistance mechanisms to linezolid

研究代表者

アウン メイジソウ（Aung, Meijisoe）

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10749584

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：リネゾリドはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌等の、薬剤耐性グラム陽性菌による感染症の治療に用いられる抗菌薬の一つである。本研究では、北海道におけるリネゾリド耐性菌および耐性遺伝子の分布状況を調査した。その結果、リネゾリド非感受性の腸球菌が1株検出された。この菌株は耐性遺伝子*optrA*を有し、アジアでの既報の菌株と遺伝子学的に類似していた。ブドウ球菌にはリネゾリド耐性菌は検出されなかったが、リネゾリドへの感受性には菌種・系統による違いが見られ、黄色ブドウ球菌の一部の系統およびコアグラ―ゼ陰性ブドウ球菌の一部の菌種で感受性の低下傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症の原因となる細菌の薬剤耐性は、人々の健康に対する重大な懸念であり、世界的な公衆衛生課題として認識されている。代表的な薬剤耐性菌にはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）をはじめとするグラム陽性菌というグループに属する一群がある。リネゾリドはそれらに対する効果的な治療薬として用いられているが、近年それらに対する耐性菌や耐性機序が世界的に報告されている。本研究では、日本におけるグラム陽性菌のリネゾリド耐性の状況を明らかにすることで、今後の薬剤耐性菌対策の基礎資料として用いられることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Linezolid is one of the antimicrobials used to treat infection with drug-resistant Gram-positive bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In this study, we investigated the distribution of linezolid-resistant bacteria and resistance genes in Hokkaido. As a result, one isolate of enterococcus non-susceptible to linezolid was detected. This isolate had the resistance gene *optrA* and was genetically similar to previously reported Asian strains. Although linezolid resistance was not detected in *Staphylococcus*, there were differences in susceptibility to linezolid depending on the bacterial species/lineages. Some lineages of *Staphylococcus aureus* and some species of coagulase-negative staphylococci showed a tendency toward decreased susceptibility.

研究分野：衛生学

キーワード：グラム陽性球菌 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 腸球菌 リネゾリド耐性 *optrA* *cfr*

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染性微生物の薬剤耐性 (AMR) は現在、国際社会における公衆衛生上の最重要課題のひとつである。ブドウ球菌をはじめとするグラム陽性球菌は世界保健機関 (WHO) が推進するグローバルアクションプランにおいても重要な対策の対象のひとつとなっている。リネゾリド (linezolid) はバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染症に対する最後の砦となる治療薬として、世界的に広く使われている抗菌薬である。リネゾリドはオキサゾリジノン系抗菌薬に属し、細菌の 50S リボソームに結合し蛋白合成を阻害することにより抗菌作用を発揮する。腸管からの吸収に優れているゆえ経口薬としても用いられるため、世界的には使用頻度が高い。米国では 2000 年、日本では 2001 年以降使用が承認され、しかも厳密な管理の下で使用されている。しかしそれにも関わらず、本薬剤の使用が始まってから数年後には耐性菌が世界各国で出現し、海外ではアウトブレイクの発生も報告されている。

グラム陽性菌におけるリネゾリド耐性の機序として、以下のことが判明している。(1) 23S rRNA (V ドメイン) の変異、(2) L3、L4 遺伝子 (リボソーム蛋白) の変異、(3) OptrA 蛋白によるリボソームの保護 (リボソームに結合した薬剤の剥奪)、(4) Cfr 蛋白による 23S rRNA のメチル化 (メチル基転移) このうち(1)、(2)は細菌ゲノム上の遺伝子変異であるが、(3)、(4)の *optrA*、*cfr* はおもにプラスミド上にも存在する新規耐性遺伝子として同定されたものである。特に世界的に増加の兆候があり懸念されているのが他の菌株に伝達しうる *optrA* と *cfr* であり、その中で *optrA* の検出頻度は世界的に高い。腸球菌、ブドウ球菌におけるリネゾリド耐性 (非感受性) 率は、世界的には 1% 未満であるが、国による違いがある。中国では *optrA* 陽性のリネゾリド耐性は腸球菌 (おもに *Enterococcus faecalis*) の 1-4% に検出され近年増加がみられる。さらに健常人の便中の腸球菌にも *optrA* が検出 (3.5%) されており、*optrA*、*cfr* を保有するプラスミドは、リネゾリドの使用が無くても本来低頻度に腸球菌に分布していると考えられる。そのプラスミドにはマクロライド耐性遺伝子も共存しているため、ヒト・動物においてリネゾリド以外の抗菌薬 (マクロライドなど) 使用によっても選択的に増加すること、腸球菌のほかさらに他の菌種 (ブドウ球菌属) にも伝播し耐性化を付与し得ることは耐性菌対策の観点から最も危惧される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、感染症の原因となったグラム陽性球菌 (黄色ブドウ球菌・MRSA、*Staphylococcus argenteus*、コアグラールゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS)、腸球菌) におけるリネゾリドへの耐性化の傾向を解析し、耐性機序とその頻度を明らかにすること、特に新規耐性遺伝子 *optrA* と *cfr* の浸淫状況を解明することである。それら耐性遺伝子の多様性および保有菌株の分子疫学的特徴を明らかにし、世界各地のヒト、動物由来菌株のデータとあわせ、リネゾリド耐性菌・耐性遺伝子の世界的な位置づけと伝播の経路を推定する。

3. 研究の方法

研究対象として用いたのは、感染症患者の検査材料から分離された黄色ブドウ球菌、*S. argenteus*、CoNS および腸球菌であった。共同研究機関である札幌臨床検査センターにおいて、北海道各地の医療機関より提出される臨床検査材料から分離された腸球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA)、*S. argenteus* を対象とし、2019 年～2023 年の間の一定期間に収集を行い保管した。そのほか、本研究以前に臨床材料、健康人、食品などから分離・保管していた MRSA、*S. argenteus*、CoNS について過去の薬剤感受性、遺伝子型などのデータを解析した。また 2021～2022 年に共同研究先のバングラデシュのマイメンシン医科大学病院で分離された菌株についても解析を行った。

被検菌株について微量液体希釈法に基づく解析キット (ドライプレート栄研、DP42) を用い、リネゾリドを含む 21 薬剤に対する MIC を測定することにより感受性を判定した。*optrA*、*cfr* その他の薬剤耐性遺伝子を PCR により検出し、必要に応じてそれらの遺伝子配列をサンガー法により決定した。一部の菌株について多座位配列型別 (MLST) に基づく ST、その他の遺伝子型を決定した。

4. 研究成果

(1) 北海道の腸球菌臨床分離株の解析

2022 年 5 月からの 4 ヶ月間、北海道各地の医療機関に由来する腸球菌 480 株 (*Enterococcus faecalis* 426 株、*Enterococcus faecium* 54 株) を収集し解析した。*E. faecalis* はすべてペニシリンに感受性であったが、約半数 (49.8%) はエリスロマイシンに耐性で、ゲンタマイシン高度耐性、リファンピシン耐性が 12.7% に見られ、キノロン耐性株も 6.8% 検出された。*E. faecium* ではほとんどがペニシリン系薬剤、レボフロキサシンに耐性 (93-97%) で、エリスロマイシン耐性も 89% に見られた。ゲンタマイシン高度耐性 (18.5%)、リファンピシン耐性 (44%) も *E. faecalis* より高率であった。マクロライド、アミノグリコシド耐性菌には *erm(B)*、*msrC*、*aac(6')-aph(2'')* などが検出され、キノロン耐性菌には *GyrA/ParC* 遺伝子における変異が同定

された。

*E. faecalis*の中に、リネゾリド非感受性株 (MIC, 4 µg/ml) が1株検出された。この株は外来患者 (74歳、女性) の尿から分離され、エリスロマイシン、レボフロキサシンのほか、chloramphenicol, florfenicol にも耐性を示し、*erm(B)*, *msrC*, *aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(9)-Ia*, *optrA*, *fexA* を有し、GyrA/ParC 遺伝子の変異も認められた。遺伝子型は ST480 で、病原因子 *asa1*, *efaA*, *esp* を有していた。*optrA* 遺伝子の配列は、そのプロトタイプである中国の pE349 で報告されているものと同じであった。*optrA* 遺伝子周辺のクラスターの配列を解析したところ、*optrA* は *fexA* と隣接しており、クラスター全体は、中国、韓国、米国、バングラデシュで臨床検体 (尿、便)、動物 (ニワトリ、ブタ、イノシシ) や食品 (豚肉、ペットフード) から分離された腸球菌のそれと類似していた。ST480 は中国やヨーロッパで *optrA* 陽性腸球菌の主要な遺伝子型として報告があるが、日本では初めての検出であり、この系統の *E. faecalis* の世界的な拡がりが見込まれた。今回検出された *optrA* 陽性株は多剤耐性を示し、多くの耐性遺伝子を示していたため、リネゾリドによる治療が行われなくとも他の薬剤により容易に選択的に増加する可能性が考えられた。

(2) 北海道における黄色ブドウ球菌、*S. argenteus* の解析

2019年8月から2年間に血液検体から分離された MRSA は279株であった。これらの株では、遺伝子群 CC(cloal complex)5 (47%)、CC1 (42%) が多くを占め、残りは CC8 (8.6%) とその他の遺伝子型であった。高病原性に関与する PVL (Panton-Valentine leukocidin) 遺伝子陽性は7株 (2.5%)、いずれも ST8 で、米国で優勢な USA300 と同じ菌株であると考えられた。それらの中で、CC5 は CC5 その他の菌株に比して多剤耐性化の傾向 (ゲンタマイシン、エリスロマイシン、レボフロキサシンへの耐性) が認められた。ただしバンコマイシン耐性株、リネゾリド非感受性株は認められず、*optrA*, *cfr* の保有も見られなかった。

2023年の4月から12月までの期間に血流感染から分離された黄色ブドウ球菌は MRSA が138株、MSSA が163株であった。MRSA では CC1 が半分を占め最も多く、残りは CC5、CC8 であった。MSSA では MRSA で見られた遺伝子型のほかにも多数の遺伝子群・型が同定され、MRSA は MSSA よりも多剤耐性の傾向が高かった。これらの菌株の中にリネゾリド非感受性株、*optrA*, *cfr* 保有株は認められなかった。

2021年4~12月の間に143株の *S. argenteus* 分離株が得られた。これは同時期に分離された黄色ブドウ球菌の約0.5%に相当する。*S. argenteus* ではメチシリン耐性菌は殆どなく、アンピシリン耐性が20%程度に見られたほかは、他の薬剤への耐性率は10%未満であり、リネゾリド非感受性株、*optrA*, *cfr* も検出されなかった。

(3) リネゾリド MIC 増高株 (2 µg/ml) の解析

米国 CLSI の判定基準において、ブドウ球菌ではリネゾリドの MIC が4 µg/ml 以下が感受性、8 µg/ml 以上が耐性とされている。今回の各種ブドウ球菌の解析では耐性菌は見られず、多くの菌株は MIC が1 µg/ml 以下であったが、最も高い MIC 値として2 µg/ml を示す菌株は認められていた。MIC 2 µg/ml は耐性ではないものの、比較的増高した MIC 値であり、耐性化の傾向を示唆するものと考えられる。そこで今回収集し解析した菌株に加え、以前に国内で集め解析した各ブドウ球菌種のデータを再調査し、菌種、遺伝子型毎に MIC 増高株 (2 µg/ml) の検出率を調べた。その結果、北海道の血液由来 MRSA では5-9%、MSSA では31%、健康人の口腔由来 MSSA では32%、*S. argenteus* では22%が MIC 値2 µg/ml であった。血液由来 MSSA では ST188 (CC1)、ST8、ST15、ST30、ST398 で30%を超える高い検出率が見られた。*S. argenteus* では ST2250 で24%であったが、他の遺伝子型 (ST1223、ST2198) では18~22%と大きな違いはなかった。食肉に由来する CoNS では34%であり、菌種別では *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *M. sciuri* で分離頻度 (>10株)、MIC 増高株の割合 (>40%) とも高かった。以上の結果から、黄色ブドウ球菌の一部の系統 (遺伝子型) および CoNS の一部の菌種で、増高したリネゾリドの MIC を示すことが分かった。今回、更なる解析は行わなかったが、MIC の増高は *optrA* のような既知の耐性機序ではなく、菌種または遺伝子型に特有の特徴に基づくものであることが示唆された。

(4) バングラデシュにおける黄色ブドウ球菌臨床分離株の解析

今回の研究期間中に、バングラデシュの共同研究機関 (マイメンシン医科大学) で分離された黄色ブドウ球菌を解析する機会があり、本研究課題であるリネゾリド耐性株、耐性遺伝子保有株に関する解析を行った。2021、2022年の間に集められた170株のうち、MRSA は61株 (36%) であった。MRSA は11のSTに分けられ、ST6が最多であり、MSSA では CC1、CC88、CC398 が多かった。MSSA の ST8-t008 (PVL 陰性) の1株に、*cfr* と *fexA* を有する株 (*optrA* 陰性) が検出され、この株はリネゾリドに感受性 (MIC, 4 µg/ml)、tedizolid にも感受性であったが、クロラムフェニコールと florfenicol には耐性であった。*fexA* の遺伝子領域は、黄色ブドウ球菌の染色体 DNA に位置する Tn558 に類似し、*cfr* の領域は黄色ブドウ球菌のプラスミドの配列に類似していたことから *fexA*, *cfr* は異なる遺伝子学的座位に位置していたと考えられた。

(5) バングラデシュにおける腸球菌の解析

以前2018-2019年に我々が行ったバングラデシュの腸球菌の解析で、*E. faecalis* 臨床分離株

210 株中 5 株 (2.4%) に *optrA* を検出し、それらが ST59、ST902、ST917 (CC59) に属していたことを報告した。今回の研究でそのうちの 1 株 (SJ88、ST59) について全ゲノム解析を行ったところ、*optrA* 遺伝子クラスターはプラスミドではなく、染色体に位置することが判明した。

さらに今回 2023 年にマイメンシン医科大学において分離された *E. faecalis* 臨床分離株 136 株を調べたところ、3 株 (2.2%) に *optrA* が検出され、それらは ST32 (2 株) と ST1902 (1 株) に分類された。これらはいずれもリネゾリド耐性 (MIC, 8 µg/ml) を示した。

[全体の総括と考察]

以上の結果をまとめると、日本においてはグラム陽性球菌におけるリネゾリド耐性は今のところ稀であると考えられるが、腸球菌においては *optrA* 保有株が分離されたことから、今後リネゾリド耐性遺伝子の拡がりや耐性菌の出現には注意が必要である。また黄色ブドウ球菌、CoNS の一部にリネゾリドの MIC が増高した菌株が高い割合で認められた。それらは耐性菌ではないものの、潜在的に耐性化の傾向を有し、低い薬剤濃度では治療が奏功しない可能性があると考えられ、その動向には注意を払う必要がある。また海外では中国などアジアを中心にリネゾリド耐性菌の拡がりや報告されており、今回の研究でもバングラデシュの腸球菌、黄色ブドウ球菌に耐性遺伝子を検出した。アジアの国々の間での人、物の移動が活発になるにつれ、それらの耐性菌、耐性遺伝子保有株も日本国内に持ち込まれる可能性は高いと考えられる。海外、特にアジアの国々における、リネゾリドその他の薬剤への耐性化の状況についても、監視していく必要があると思われる。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ohashi N, Hirose M, Kudo K, Tsukamoto N, Ito M, Kobayashi N	4. 巻 12
2. 論文標題 Antimicrobial Resistance, Virulence Factors, and Genotypes of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Clinical Isolates in Northern Japan: Identification of optrA in ST480 E. faecalis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics12010108	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 -
1. 著者名 Aung MS, San T, Urushibara N, San N, Hlaing MS, Soe PE, Htut WHW, Moe I, Mon WLY, Chan ZCN, Kobayashi N	4. 巻 28
2. 論文標題 Clonal diversity and molecular characteristics of methicillin-susceptible and -resistant Staphylococcus aureus from pediatric patients in Myanmar.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 191-198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mdr.2021.0051	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 該当する
1. 著者名 Hirose M, Aung MS, Fukuda A, Yahata S, Fujita Y, Saitoh M, Hirose Y, Urushibara N, Kobayashi N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Antimicrobial resistance and molecular epidemiological characteristics of methicillin-resistant and susceptible staphylococcal isolates from oral cavity of dental patients and staff in northern Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 1316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics10111316	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 -

1. 著者名 Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Hirose M, Ito M, Habadera S, Kobayashi N	4. 巻 24
2. 論文標題 Clonal diversity of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) from bloodstream infections in northern Japan : identification of spermidine N-acetyltransferase gene (speG) in staphylococcal cassette chromosomes (SCCs) associated with type II and IV SCCmec.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Glob Antimicrob Resist	6. 最初と最後の頁 207-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2020.12.008	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 -

1. 著者名 Osada M, Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ohashi N, Hirose M, Kobayashi N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prevalence and Antimicrobial Resistance of <i>Staphylococcus aureus</i> and Coagulase-Negative <i>Staphylococcus/Mammaliococcus</i> from Retail Ground Meat: Identification of Broad Genetic Diversity in Fosfomycin Resistance Gene fosB.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens11040469	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小林宣道、ロイ サンジュクタ、アウンメイジソウ、漆原範子、川口谷充代
2. 発表標題 バングラデシュにおける腸球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> の薬剤耐性と分子疫学的特徴
3. 学会等名 第93回日本衛生学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Meiji Soe Aung
2. 発表標題 Molecular epidemiology of Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Staphylococcus argenteus</i> clinical isolates in Japan.
3. 学会等名 26th Congress of the Latin American Federation of Parasitology, 15th Central American and Caribbean Congress of Parasitology and Tropical Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 漆原範子、アウンメイジソウ、川口谷充代、大橋伸英、小林宣道
2. 発表標題 市販鶏・豚肉より分離されたブドウ球菌属細菌の性状解析
3. 学会等名 第93回日本衛生学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 漆原範子、Meiji Soe Aung、川口谷充代、小林宣道
2. 発表標題 ベースメーカー関連菌血症患者から分離されたバンコマイシン中等度耐性 MRSA のゲノム解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 アウン メイジソウ、漆原範子、川口谷充代、伊藤政彦、幅寺敏、廣瀬弥奈、小林宣道 .
2. 発表標題 北日本における血流感染由来MRSAの分子疫学 .
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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	小林 宣道 (Kobayashi Nobumichi) (80186759)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

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	漆原 範子 (Urushibara Noriko)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	
研究協力者	川口谷 充代 (Kawaguchiya Mitsuyo)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究協力者	大橋 伸英 (Ohashi Nobuhide)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究協力者	廣瀬 弥奈 (Hirose Mina)	北海道医療大学・歯学部・准教授	
研究協力者	長田 雅子 (Osada Masako)	天使大学・助産研究科・講師	

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			
バングラデシュ	マイメンシン医科大学			