

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590610

研究課題名(和文)メタロラクタマーゼ産生腸内細菌の分布調査及び早期診断法の検討

研究課題名(英文)Molecular characteristics and Identification of metallo-beta-lactamase producing Enterobacteriae.

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラクタマーゼは細菌が産生する酵素であり、ラクタム剤の効果をなくすため、細菌感染治療を困難にする危険性がある。本研究ではラクタマーゼの一つで、治療の切り札であるカルバペネム耐性をもつメタロラクタマーゼ(MBL)産生腸内細菌に着目した。腸内細菌のうち、サルモネラ200株、大腸菌74株、カルバペネム耐性が疑われる腸内細菌35株を集め、これらの薬剤感受性試験やラクタマーゼ関連遺伝子の検出、疫学的調査を行った。サルモネラ2株と大腸菌72株から基質特異性拡張型ラクタマーゼ(ESBL)産生性、カルバペネム耐性が疑われる腸内細菌では17株からMBL産生性が検出され、日本での蔓延が危惧される。

研究成果の概要(英文)：The spread of  $\beta$ -lactamases that hydrolyze  $\beta$ -lactam antibiotics has limited options for treating bacterial infections. The prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) producing Enterobacteriae has been increasing worldwide. In this study, we investigated the molecular characteristics of 200 strains of Salmonella, 74 strains of Escherichia coli, and 35 strains of Enterobacteriae with resistance for carbapenem antibiotics. We performed the antimicrobial susceptibility tests and detected  $\beta$ -lactamase related genes, and epidemiology typing by PCR and sequencing technique. Two strains of Salmonella and 72 strains of Escherichia coli has extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), with resistance for major  $\beta$ -lactam antibiotics, related genes represented a majority worldwide. Of 35 strains in Enterobacteriae with resistance for carbapenem, 17 strains has MBL related genes. In conclusion, we confirmed that ESBL and MBL producing Enterobacteriae has emerged in Japan.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 抗菌薬 薬剤耐性 分子疫学 メタロラクタマーゼ 基質特異性拡張型ラクタマーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

メタロ βラクタマーゼ (MBL) について: 近年、抗生物質などの薬剤の大量使用に伴って、抗菌薬に耐性を示す病原菌が急速に増加していきっている。細菌の薬剤耐性機構のひとつである βラクタマーゼの一種である MBL は βラクタム系 (ペニシリン系、セファロスポリン系) 抗菌薬の不活化である。MBL は第3世代セフェムだけでなく、イミペネムを筆とするカルバペネム系抗菌薬をも分解してしまい、もっとも危険な βラクタマーゼと考えられている。MBL であるということは単剤では全ての βラクタム系抗菌薬が効果を示さない (ペニシリンやセファロスポリンを非常によく分解するものもある) ということであり、更に厄介なことに現在使用されている βラクタマーゼ阻害剤も全く効果を示さないということであり、これまではグラム陽性菌が βラクタマーゼ産生により耐性菌化してきたが、MBL として検出されたのはグラム陰性細菌である。

世界における分離状況: MBL は近年では、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酵素「ニューデリー・メタロ βラクタマーゼ1 (NDM-1)」を産生する、新型の多剤耐性菌の感染事例が、インドやパキスタンで増加しているとの報告がある。すなわち、大腸菌や肺炎桿菌のペニシリナーゼ遺伝子の変異して、セファロスポリン系抗菌薬を分解するようになった βラクタマーゼに、更に変異が加わったために酵素の基質となる βラクタム系抗菌薬の種類が増えたためである。NDM-1 産生株について調べられたところでは、国内未承認のチゲサイクリンやコリスチン以外の広域 βラクタム系抗菌薬やフルオロキノロン系、アミノ配糖体系など、ほとんどの抗菌薬に高度耐性を示すことが報告されている。

日本国内における分離状況: 日本国内においては、日和見細菌である緑膿菌やアシネトバクター菌などから分離されていたが、NDM-1 のような MBL 産生菌の出現が数例報告されており、今後増える可能性が示唆される。このような現状をかんがみ、今後、益々腸内細菌科の MBL 産生菌の早期検出は院内感染予防上のきわめて重要な課題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、神戸大学附属病院関連施設から分離される腸内細菌科の株を詳細に解析し、βラクタマーゼ産生細菌、特に MBL 産生株の分布状況を確認し、今後の院内感染対策に役立つ情報を集める。従来の MBL 関連遺伝子について早期に検出できる方法を探る。

(学術的特色・独創的な点)

いままで、日本で発見されていない MBL 産生腸内細菌の確認をし、今後の院内感染対策に役立つモニタリング方法を確立する。MBL 産生細菌の問題を深刻にしているのは

一般感染症の起炎菌としても頻度の高い大腸菌や肺炎桿菌の割合が高いことである。大腸菌や肺炎桿菌は腸内細菌として、ヒトの腸管内に常在している細菌であり、MBL はプラスミド接合で伝達されるため、赤痢菌やサルモネラ属菌といった病原性の高い細菌に今後伝播・蔓延した場合には、重症・難治例が増加するのではないかと考えられ、今後、市中に蔓延していく可能性も懸念されるため、世界的に大きな健康問題を引き起こすことが危惧されている。以前、我々がインドネシアで行った調査において、イミペネム以外の全ての試験薬剤に耐性を示す多剤耐性腸チフス菌株が検出されたが、このような多剤耐性菌がプラスミドを通じて MBL を獲得した場合の社会的なインパクトの大きさは極めて甚大である。

(予想される結果と意義)

日本国内の MBL 産生細菌の分布が新規 βラクタマーゼ関連遺伝子の探索及びこれらの早期・新規診断方法の活率が行われれば、耐性菌に対する対応が早期に行えるために今後の院内感染対策及び治療対策に大いに貢献することができる。

### 3. 研究の方法

材料: 神戸大学医学部附属病院関連施設にご協力いただき、腸内細菌科のサルモネラ属 200 株、大腸菌 74 株、カルバペネム系薬剤に耐性と疑われた腸内細菌科の株 35 株を収集した。

#### 薬剤感受性試験

CLST の基準に基づき、ディスク法と寒天平板希釈法、微量液体希釈法を用いた。

βラクタム系薬剤のほか、メタロ βラクタマーゼ以外の耐性菌 (テトラサイクリン系、アミノ配糖体系、クロラムフェニコール、キノロン系薬剤) の検出も行った。

MBL 産生性については、確認テストとして、変法ホッジテスト、MBL 阻害剤であるメルカプト酢酸を用いた SMA 法を行った。さらには βラクタマーゼとして、現在病院内にて多く検出されている基質特異性拡張型 βラクタマーゼ (ESBL) 産生菌が疑われる場合、ダブルディスクシナジーテスト (DDST) を行い、ESBL の検出も同時に行った。

#### 遺伝子解析

MBL では IMP 型、NDM 型、VIM 型や、その他にも KPC 型、OXA-48 型などが知られている。これらの DNA を抽出して、PCR を行い、MBL 産生菌特異的な遺伝子群 (*bla<sub>IMP</sub>*、*bla<sub>NDM</sub>*、*bla<sub>VIM</sub>*、*bla<sub>KPC</sub>*、*bla<sub>OXA</sub>*)、ESBL 産生菌特異的な遺伝子群 (*bla<sub>CTM</sub>*、*bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>SHV</sub>*) を検出して、シーケンス解析を行った。さらには、キノロン耐性遺伝子 (*gyrA*、*parC*) なども確認した。

プラスミドの型別として 18 種類 (F, FII, FIB, FIA, FIC, HI1, HI2, Ille, L/M, W, T, A/C, K, N, P, X, Y, B/O) を分けた。

大腸菌の病原遺伝子として付着などに関わ

る9つの遺伝子群(*papC*, *papEF*, *fimH*, *hlyA*, *iutA*, *sfa*, *eaeA*, *bfpA*, *aggR*)を検出した。大腸菌には系統的な遺伝子としてA, B1, B2, Dがあり、これらの検出も行った。疫学的調査方法として、数メガサイズの巨大DNA分子を制限酵素により消化し時間をかけてアガロースゲルをすり抜けさせるパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)染色体上の回文配列を用いた Extragenic palindromic sequence (rep)-PCR や7つのハウスキーピング遺伝子を用いて型別を行う Multi Locus Sequence Typing (MLST)により、菌株同士の相同性を確認した。統計解析は Fisher's exact test やロジスティック回帰解析を用いた。

#### 4. 研究成果

##### サルモネラ属菌(文献)

サルモネラ属菌200株のうち、薬剤耐性が認められたのは43株であり、そのうち、キノロン系薬剤耐性は8株であった。キノロン耐性株では *gyrA* や *parC* といった染色体上の遺伝子変異が認められた。カルバペネム系薬剤耐性菌は認められなかったものの、DDSTの結果よりESBL産生菌として2株検出し、*bla<sub>CTX</sub>*を確認し、それぞれCTX-M-15型とCTX-M-2型であると確認できた。これらのPFGEにて解析したところ、それぞれの属において薬剤耐性をもつ株の近縁性が認められ、ひとつのクローンからの派生に基づいて薬剤耐性が広がっている可能性が確認された。

##### 大腸菌(文献、学会発表)

大腸菌74株について、カルバペネム耐性は認められなかったものの72株はDDSTによりESBLと確認された。ESBL産生菌については同時にキノロン系薬剤耐性を伴っていた。これらのO型はO25がもっとも多く、40.3%(34/72)に認められ、そのうち世界のESBLクローンとして有名なO25:H4は29株であった。*bla<sub>CTX</sub>*陽性となった株についてシーケンス解析を行ったところ、CTX-M-14が最も多く45.8%(33/72)、次にCTX-M-27が19.4%(14/72)であった。世界でESBLクローンとして知られているCTX-M-15は12.5%(9/72)であった。29株のO25:H4はCTX-M-14、CTX-M-15、CTX-M-27がMLSTにおけるST131に分類された。repPCRでは18グループに分けられ、O25、CTX-M-15、ST131は同一グループになった。これらは病原性の疑われる系統であるB2に分類された。プラスミド解析結果としては、F型がもっとも多く65株(90.3%)であり、次にFIB型が多かった。病原遺伝子として最も多く検出されたのは*iutA*が71株(98.6%)であり、次に*aggR*であり、付着に関わる遺伝子の検出が多いことがわかった。ロジスティック回帰解析の結果、CTX-M-14を含むCTX-M-9グループにおい

て*papC*や*papEF*、*hlyA*をもつことが有意に認められた。このように日本においても世界で蔓延しているCTX-M-15のESBL産生大腸菌O25:H4 ST131が増えてきていることが確認され、さらにはもっとも多く検出されたCTX-M-14を含むCTX-M-9グループでは病原遺伝子との関連が深いことがわかった。

##### MBL産生腸内細菌(学会発表)

MBL産生株は肺炎桿菌9株、大腸菌8株の48.6%(17/35株)であり、PCRの結果、17株は全て*bla<sub>IMP</sub>*陽性となった。また、*bla<sub>KPC</sub>*陽性は大腸菌のみみられ、25%(2/8株)であった。*bla<sub>IMP</sub>*陽性株はイミペネム(IPM)耐性が29.4%(5/17株)、メロペネム(MEPM)耐性が88.2%(15/17株)であった。薬剤感受性試験の結果をもとに統計解析を行うと、*bla<sub>IMP</sub>*陽性株のうち、キノロン系薬剤に耐性を示した株は88.2%(15/17株)となり、*bla<sub>IMP</sub>*陰性株と比較して耐性の割合が高かった(Fisher's exact test;  $p=0.04$ )。*bla<sub>IMP</sub>*陽性株はシーケンス解析により、全てIMP-6型MBLであり、肺炎桿菌100%(9/9株)、大腸菌87.5%(7/8株)であった。MLSTの結果、IMP-6型MBL産生株は、肺炎桿菌では88.9%(8/9株)がST37、11.1%(1/9株)はST23、*E. coli*では全ての株がST131に分類された。IMP-6型MBLは、IMP-1型のアミノ酸配列の一部が置換したもので、主にMEPMには耐性を示すがIPMには感性となる。また、IMP-6型MBL産生株のうち肺炎桿菌では88.9%(8/9株)がMLST解析によりST37、大腸菌では全ての株がST131であり、これらの株の流行が危惧される。

##### 新たな検出方法の確立

共同研究者の吉田を中心に、下記の検討を行った。これまで知られている変法ホッジテスト及びSMA法のほか、ポロン酸テストでも完全にメタロラクタマーゼを網羅するとはいえなかった。そこで、カルバペネム系薬剤であるファロペネムディスクを用いて薬剤感受性試験のディスク法において、阻止円の半径を12mm以下となっていれば、メタロラクタマーゼを疑うことはできるが、感度100%、特異度85%となっており、確実とはいえない。さらには近年報告されているカルバNPテストと呼ばれる検出方法も試みても、IPM型でも陰性株があり、メタロラクタマーゼ産生菌の検出法として確立することはできなかった。

#### 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2件)

Osawa Kayo, Shigemura Katsumi, Shimizu Rika, Kato Ayaka, Kimura Mayuha, Katayama Yuki, Okuya Yuma, Yutaka Shotaro, Nishimoto Akiko, Kishi

Akane, Fujiwara Miki, Yoshida Hiroyuki, Iijima Yoshio, Fujisawa Masato, Shirakawa Toshiro.

Antimicrobial resistance in Salmonella strains clinically isolated in Hyogo, Japan (2009-2012).

Jpn J Infect Dis. 2014;67(1):54-7.

Osawa Kayo, Shigemura Katsumi, Shimizu Rika, Kato Ayaka, Kusuki Mari, Jikimoto Takumi, Nakamura Tatsuya, Yoshida Hiroyuki, Arakawa Soichi, Fujisawa Masato, Shirakawa Toshiro.

Molecular characteristics of extended-spectrum

$\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli in a university teaching hospital.

Microb Drug Resist. 2015;21(2):130-9.

doi: 10.1089/mdr.2014.0083.

〔学会発表〕(計 2 件)

— 大澤 佳代、重村 克巳、吉田 弘之、藤原 美樹、荒川 創一、藤澤 正人、白川 利朗

兵庫県下で分離されたメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生腸内細菌の解析

第 88 回日本感染症学会学術講演会

2014 年 6 月 19 日

ヒルトン福岡シーホーク(福岡県)

大澤 佳代、吉田 弘之、重村 克巳、楠 まり、直本 拓己、中村 竜也、荒川 創一、藤澤 正人、白川 利朗

当院で分離された ESBLs 産生 Escherichia coli の遺伝子解析

第 88 回日本感染症学会学術講演会

2014 年 6 月 19 日

ヒルトン福岡シーホーク(福岡県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

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: 5 0 3 2 4 9 4 2

(2) 研究分担者

吉田 弘之 (YOSHIDA Hiroyuki)

神戸大学医学部附属病院・感染制御部

研究者番号: 4 0 6 2 6 2 4 8

白川 利朗 (SHIRAKAWA Toshiro)

神戸大学大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 7 0 3 3 5 4 4 6