

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790432

研究課題名(和文) 高度多剤耐性緑膿菌におけるアミノグリコシド高度耐性遺伝子の解析

研究課題名(英文) Analysis of aminoglycoside-resistant genes in highly multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

多田 達哉 (Tada, Tatsuya)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：00624644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：2011年に日本の医療施設から収集した多剤耐性緑膿菌300株を解析した結果、新規アミノグリコシド耐性因子AAC(6')-Iajを同定した。AAC(6')-Iajは日本で広く分離される多剤耐性緑膿菌が保有するAAC(6')-Iaeに比べてアルベカシン耐性度が高かった。また、2012年度に分離された多剤耐性緑膿菌300株を解析した結果、IMP-typeメタロ-β-ラクタマーゼの新規バリエーションIMP-43およびIMP-44を同定した。これらのIMPバリエーションはよりカルバペネム分解能が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We performed a molecular epidemiological study of 300 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in 2011 in Japan. Of them, we found a novel aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase gene, *aac(6')-Iaj*. The encoded protein, AAC(6')-Iaj, was found to consist of 184 amino acids, with 70% identity to AAC(6')-Iae. *Escherichia coli* transformed with a plasmid containing the *aac(6')-Iaj* gene acquired resistance to all aminoglycosides tested except gentamicin. Of note, *aac(6')-Iaj* contributed to the resistance to *rbekacin*.

In 2012, we found two novel IMP-type metallo-beta-lactamase variants, IMP-43 and IMP-44, which were identified in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained in medical settings in Japan. These two variants had more efficient catalytic activities against all carbapenems tested, including dripenem, imipenem, meropenem and panipenem.

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：疫学

キーワード：多剤耐性緑膿菌 分子疫学 薬剤耐性因子 アミノグリコシド β-ラクタマーゼ

1. 研究開始当初の背景

日本の医療施設において、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多剤耐性緑膿菌 (MDRP) が大きな問題となっている。その中でも、高度薬剤耐性を示す高度多剤耐性緑膿菌が全国の医療施設から分離され、これらの新興を一刻も早く阻止しなければならない。

高度耐性の獲得機構として、カルバペネム系薬を加水分解する IMP や VIM といった酵素をコードする遺伝子 *blaIMP*、*blaVIM* あるいはアミノグリコシド系薬をアセチル化するアミノグリコシドアセチル化酵素 (AAC) をコードする遺伝子の獲得である。これらの耐性遺伝子は染色体あるいはプラスミド上に *class1* インテグロンと呼ばれる可動性薬剤耐性カセットを獲得することにより、 β -ラクタムやアミノグリコシド系薬に対して耐性化することが多く、薬剤耐性遺伝子を含むジーンカセットを非耐性菌へと伝播させることにより、耐性菌の出現に強く影響を及ぼすことが知られている。

我々は2004年、仙台の医療施設から分離された高度多剤耐性緑膿菌 (以下、NCGM2.S1) 株からゲノム内に存在するインテグロン *In113* を同定し、その内部には

ラクタマーゼ IMP-1 および新規アミノグリコシドアセチル化酵素産生遺伝子 *aac(6')-lae* を見出した。*AAC(6')-lae* 産生多剤耐性緑膿菌は2010年には24都道府県から分離され、全国に広まっていることが分かっている。また、2008年に西日本の医療施設から分離された緑膿菌2株のインテグロン内部に新規アミノグリコシドアセチル化酵素産生遺伝子 *aac(6')-laf* を同定した。

日本において高度多剤耐性緑膿菌に焦点を当てた研究は他にない。また、アミノグリコシド系薬の乱用が目立つ東南アジアの医療施設との共同研究から、日本だけでなく東南アジアでアウトブレイクしている高度多剤耐性緑膿菌にも目を向け、アミノグリコシド高度耐性に寄与する流行性および新規薬剤耐性因子を解析することは、今後の迅速診断法開発の基盤となり、医療施設における院内感染の早期摘発および早期対策の強化を促すのに重要であると考えられる。

2. 研究の目的

高度多剤耐性緑膿菌が日本や東南アジアの医療施設で新興し、院内感染対策上の大き

な脅威となっている。本研究の目的は、日本国内及びベトナムの医療施設から分離された高度多剤耐性緑膿菌株の詳細な分子疫学解析を通して、アミノグリコシド高度多剤耐性に関与する遺伝子を同定するとともにこの遺伝子産物の機能を解析することである。

3. 研究の方法

多剤耐性緑膿菌臨床分離株に対し、PFGE パターンからクラスター解析を行うと共に

ラクタム系薬キノロン系薬およびアミノグリコシド系薬において薬剤耐性プロファイルを作製する。作成したプロファイルを基に、アミノグリコシドに高度耐性を持つ緑膿菌をスクリーニングする。高度耐性に寄与する原因遺伝子を特定し、流行性あるいは新規薬剤耐性遺伝子を見出す。新規薬剤耐性遺伝子に関しては大腸菌にクローニングし、薬剤耐性プロファイルを作製すると共に、酵素活性の解析、エピトープ解析を行う。

さらに、東南アジアで分離された緑膿菌およびアシネトバクターバウマニー臨床分離株や当研究センターで分離された臨床分離株を対象に、ラクタムおよびアミノグリコシド系薬に高度耐性をもつ菌株の原因遺伝子を特定する。アシネトバクターバウマニーは緑膿菌と同様にグラム陰性桿菌に属し、菌種間でのプラスミド伝達による高度耐性獲得も示唆されている。アシネトバクターは緑膿菌よりも多種の薬剤耐性遺伝子を含んでいるため、 β -ラクタム系薬耐性はメタロ β -ラクタマーゼ遺伝子にターゲットを絞って研究を行う。

4. 研究成果

H24年度は日本および東南アジアの医療施設から収集した多剤耐性緑膿菌300株の薬剤耐性プロファイルを決定した。全株からゲノムを抽出し、薬剤耐性因子を決定したところ、2011年度に分離された多剤耐性緑膿菌から新規アミノグリコシド耐性因子 *AAC(6')-laj* を同定した。*aac(6')-laj* 上流にはクラス *1* インテグロンが存在し、*aac(6')-laj* を含む integron は染色体 DNA 上に存在していることが分かった。*AAC(6')-laj* のアミノ酸配列は *AAC(6')-la* のアミノ酸と比較すると70%の相同性であった。*aac(6')-laj* を大腸菌にクローニングし、各種アミノグリコシド系薬で MIC を測定すると、現在日本で広がっている *AAC(6')-lae* に比べ、アルベカシンに対する耐性が高かった。

また、2012年に日本の医療施設から分離された多剤耐性緑膿菌 300 株の分子疫学解析を行った結果、新規 IMP メタロ- β -ラクタマーゼバリエント IMP-43 および IMP-44 が同定された。これらのバリエントはイミペネム、メロペネムおよびドリペネムに対して酵素活性が高かった。

これらのバリエントは関東地方を中心に数株分離されており、今後、モニタリングが必要であると考えられた。

東南アジアの医療施設で分離された多剤耐性緑膿菌からは高度アミノグリコシド耐性に関与する 16S rRNA メチラーゼ産生菌が高頻度で分離された。

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 8 件)

・ Tatsuya Tada, Tohru Miyoshi-Akiyama, Kayo Shimada, Teruo Kirikae: Biochemical analysis of metallo- β -lactamase NDM-3 from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:3538-3540, 2014

・ Tatsuya Tada, Tohru Miyoshi-Akiyama, Kayo Shimada, Masahiro Shimojima, Teruo Kirikae: Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and emergence of OXA-72 carbapenemase coproducers in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:2916-2920, 2014

・ Tatsuya Tada, Tohru Miyoshi-Akiyama, Rajan K. Dahal, Manoj K. Sah, Hiroshi Ohara, Kayo Shimada, Teruo Kirikae, Bharat M. Pokhrel: NDM-1 metallo β -lactamase and ArmA 16S rRNA methylase producing *Providencia rettgeri* clinical isolates in Nepal. *BMC Infect Dis.* 14: 56, 2014.

・ Tatsuya Tada, Tohru Miyoshi-Akiyama, Rajan K. Dahal, Shyam K. Mishra, Hiroshi Ohara, Kayo Shimada, Teruo Kirikae, Bharat M. Pokhrel: Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *Int J Antimicrob Agents.* 42: 372-374, 2013.

・ Tatsuya Tada, Tohru Miyoshi-Akiyama, Kayo Shimada, Masahiro Shimojima, Teruo Kirikae: IMP-43 and IMP-44 metallo- β -lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 4427-4432, 2013.

・ Tatsuya Tada, Tohru Miyoshi-Akiyama, Yasuyuki Kato, Norio Ohmagari, Nozomi Takeshita, Nguyen V. Hung, Doan M. Phuong, Truong A. Thu, Nguyen G. Binh, Nguyen Q. Anh, Tran T. T. Nga, Pham H. Truong, Phan T. Xuan, Le T. A. Thu, Nguyen T. Son,⁵, Teruo Kirikae: Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Vietnam. *BMC Infect Dis.* 13: 251, 2013.

・ Tatsuya Tada, Tohru Miyoshi-Akiyama, Rajan K. Dahal, Manoj K. Sah, Hiroshi Ohara, Teruo Kirikae, Bharat M. Pokhrel: NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 2394-2396, 2013.

・ Tatsuya Tada, Tohru Miyoshi-Akiyama, Kayo Shimada, Masahiro Shimojima, Teruo Kirikae: Novel 6'-n-aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 96-100, 2013. IF: 4.565

[学会発表](計 3 件)

・ 多田達哉、秋山徹、切替照雄
日本の医療施設で分離された IMP-43 および IMP-44 産生多剤耐性緑膿菌
第 87 回日本細菌学会

・ 切替照雄、多田達哉、秋山徹、
日本の医療施設で分離される多剤耐性アシネトバクターバウマニーの分子疫学解析
第 87 回日本細菌学会

・ 多田達哉、秋山徹、島田佳世、小原博、Pokhrel M. Bharat、切替照雄
ネパールの医療施設で分離された院内感染起因菌としての多剤耐性グラム陰性菌の解析
第 42 回薬剤耐性菌研究会

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
研究業績
[http://www.rincgm.jp/individual/lab03/
did_japanese/Publicationjp.html](http://www.rincgm.jp/individual/lab03/did_japanese/Publicationjp.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
多田達哉（国立国際医療研究センター研
究所、研究員）

研究者番号：00624644

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：