

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790546

研究課題名(和文) *S. maltophilia* の薬剤感受性および耐性遺伝子に関する分子疫学的研究研究課題名(英文) Antimicrobial Susceptibility and Molecular Epidemiology of Drug Resistance in *S. maltophilia*

研究代表者

金森 肇 (KANAMORI, HAJIME)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70625318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：*S. maltophilia*は多くの抗菌薬に自然耐性を示し、その感染症は治療が困難である。近年、新規のキノロン耐性遺伝子(Smqnr)が報告されている。本研究では本邦における*S. maltophilia*の薬剤感受性およびSmqnrの保有率について調査した。セフトラジム、レボフロキサシン、ST合剤、ミノサイクリンの耐性率はそれぞれ、67%、6%、18%、0%であった。Smqnrは約6割と高頻度に検出され、Smqnrの頻度に地域差を認めた。本研究より新規のSmqnr variantsを発見した。

研究成果の概要(英文)：Stenotrophomonas maltophilia infections are difficult to treat as the bacterium exhibits high-level intrinsic resistance to a variety of antimicrobial agents. Smqnr have been recently identified in *S. maltophilia* as a novel chromosomal quinolone resistance gene. In this study, we investigated the antimicrobial susceptibility and the prevalence of Smqnr among *S. maltophilia* isolates in Japan. Resistance rates to ceftazidime, levofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and minocycline were 67%, 6%, 18%, and 0%, respectively. Smqnr was detected at high frequencies in *S. maltophilia* isolates (approximately 60%), and there were regional differences in Smqnr frequency. In this study, we described novel variants of Smqnr.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：感染症 *S. maltophilia* 薬剤感受性 Smqnr

## 1. 研究開始当初の背景

多剤耐性の *Pseudomonas aeruginosa* や *Acinetobacter baumannii* による病院感染症やアウトブレイク事例が国内外で大きな問題となっている。*Stenotrophomonas maltophilia* は、これらの菌種と同様にブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌に分類され、土壌、汚水、植物など湿潤な環境下に生息する。病院内環境では水道水、ネブライザー、人工呼吸器回路、消毒薬の汚染などから分離される。本邦における高度先進医療、移植医療、抗癌剤や免疫抑制剤の進歩、易感染性宿主 (compromised host) の増加、広域抗菌薬の普及に伴い、*S. maltophilia* による日和見感染症や病院感染症が今後ますます増加することが予想される。*S. maltophilia* の病原性は一般的に弱いとされるが、気道から検出された場合、他の呼吸器病原体 (*P. aeruginosa*、*Serratia marcescens* など) が同時に検出されることが多く、血流感染症やカテーテル関連血流感染では重複感染が 20-40% とされ、感染の原因菌が定着菌であるかの判断は必ずしも容易ではない (Eur Respir J 2005;25:911-14, Lancet Infect Dis 2009;9:312-23)。*S. maltophilia* による感染症としては、肺炎が最も多く、次いで血流感染、創部感染、尿路感染症などがあり、感染症の原因菌となった場合の死亡率は非常に高く、菌血症で 12.5~41%、肺炎で 40~50%、心内膜炎では 39% と報告されている (J Hosp Infect 2004;57:1-7, Lancet Infect Dis 2009;9:312-23)。

*S. maltophilia* は、ほとんどのペニシリンとセファロスポリン、すべてのカルバペネム系薬に対して自然耐性で、 $\beta$ -ラクタム系薬はほとんど活性を示さないため、治療薬は極めて限定的である。したがって、*S. maltophilia* 感染症に対する治療薬としては、ST 合剤、チカルシリン・クラバン酸、テトラサイクリン系薬やキノロン系薬などが使用される。国際的なサーベイランスによると、ST 合剤、チカルシリン・クラバン酸、シプロフロキサシン、レボフロキサシンの耐性率はそれぞれ、4.7%、16.1%、40%、6.5% と報告されている (Int J Antimicrob Agents 2005;25:95-109)。*S. maltophilia* の薬剤感受性は国や地域によって大きく異なっているが、*S. maltophilia* の薬剤感受性や耐性遺伝子に関するデータは国や地域によって異なっているが、本邦のデータは不十分である。

キノロン耐性に関しては、グラム陰性桿菌では従来その耐性機構は染色体上に存在し、DNA ジャイレースやトポイソメラーゼの変異や外膜透過性の減少、薬剤排出蛋白の発現などによるものであったが、プラスミド性キノロン耐性遺伝子 (plasmid-mediated quinolone resistance; PMQR) の存在が明らかとなった。PMQR 遺伝子として、キノロン系薬の DNA ジャイレース阻害を抑制する蛋白質

をコードしている *qnr*、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼをコードする *aac(6')-Ib* の変異遺伝子である *aac(6')-Ib-cr*、薬剤排出ポンプをコードしている *qepA* が報告され、さらに  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子と PMQR 遺伝子を同時に保有する腸内細菌科の出現によって、その薬剤耐性機構の世界的な拡がり懸念されている (Lancet Infect Dis 2006;6:629-640, Clin Microbiol Rev 2009;22:664-689)。

研究代表者および所属研究室は、国内外で  $\beta$ -ラクタマーゼおよびキノロン耐性遺伝子に関する研究を実施し、成果を挙げてきた (J Antimicrob Chemother 2011;66:2255-62, Acta Trop 2011;120:140-5)。*S. maltophilia* においては、ペントペプチド反復タンパク質をコードする新規のキノロン耐性遺伝子 (*Smqnr*) が同定され、*Smqnr* のキノロン系薬に対する潜在的耐性への関連性が報告されている (Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3823-5, J Antimicrob Chemother 2010;65:483-9)。

## 2. 研究の目的

*S. maltophilia* の薬剤感受性および耐性遺伝子に関する分子疫学的研究を考案した。全国から収集した *S. maltophilia* の臨床分離株を用いて、本邦における *S. maltophilia* の薬剤感受性、*S. maltophilia* が保有する *Smqnr* および PMQR 遺伝子について調査する。耐性株の地域特性や国内流行クローンの伝播状況を解明する。

## 3. 研究の方法

### 【対象菌株】

国内 4 都道府県 (北海道、東京都、大阪府、福岡県) の医療機関から収集した *S. maltophilia* 臨床分離株を対象とした。同一患者からの菌株については、初回分離株を対象とし、重複例を除いた。

### 【薬剤感受性試験】

Clinical and Laboratory Standards Institute に準じて、微量液体希釈法により各種抗菌薬の最小発育阻止濃度を測定した。精度管理株として *Escherichia coli* ATCC 25922 株、ATCC 35218 株を用いた。

### 【PCR 法・シーケンス解析】

*Smqnr* コンセンサスプライマーとして、5'-ACACAGAACGGCTGGACTGC-3' および 5'-TTCAACGACGTGGAGCTGT-3' 用いて PCR 法を行い (Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3823-5, J Antimicrob Chemother 2010;65:483-9)、*Smqnr* 遺伝子を検出した。

得られた PCR 増幅産物は ABI3730xl Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いてシーケンス解析を行った。相同性検索のために BLAST 解析を行い (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、*Smqnr* 遺伝子の型別を決定した。

PMQR 遺伝子に関してはマルチプレックス PCR 法を行い (Antimicrob Agents Chemother 2009;53:639-45)、*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrS*、*aac(6')-Ib* および *qepA* を検出した。*aac(6')-Ib* の PCR 増幅産物はシーケンス解析を行い、*-cr variant* の有無を確認した。

#### 【PFGE 解析】

*Smqnr* を保有する *S. maltophilia* に対して、制限酵素 XbaI (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) によるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行った。電気泳動は CHEF-DR III system (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) を用いて行い、電気泳動パターンは GelCompar II version 3.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

薬剤感受性結果では、セフトアジジム、レボフロキサシン、ST 合剤、クロラムフェニコールの耐性率はそれぞれ、67%、6%、18%、9%であった。ミノサイクリンは対象株すべてにおいて感性を示した。

解析した *S. maltophilia* 臨床分離株の約 6 割において *Smqnr* が検出され、各地域での *Smqnr* を保有する頻度は 47~70% と地域差を認めた。型別では *Smqnr6* が最も多かった。

本研究より 11 種類の新規 *Smqnr* variants を発見した (*Smqnr48*, AB852568; *Smqnr49*, AB852569; *Smqnr50*, AB852570; *Smqnr51*, AB852571; *Smqnr52*, AB852572; *Smqnr53*, AB852573; *Smqnr54*, AB905279; *Smqnr55*, AB905280; *Smqnr56*, AB905281; *Smqnr57*, AB905282; *Smqnr58*, AB905283)。

新規 *Smqnr* variants を含み、現在報告されている *Smqnr* の系統樹解析結果を図 1 に示す。系統樹は ClustalW2.1 より作成した (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/searches-j.html>)。また、PMQR 遺伝子に関しては、*qnr* および *qepA* は検出されなかったが、*aac(6')-Ib-cr* を 5% に認めた。

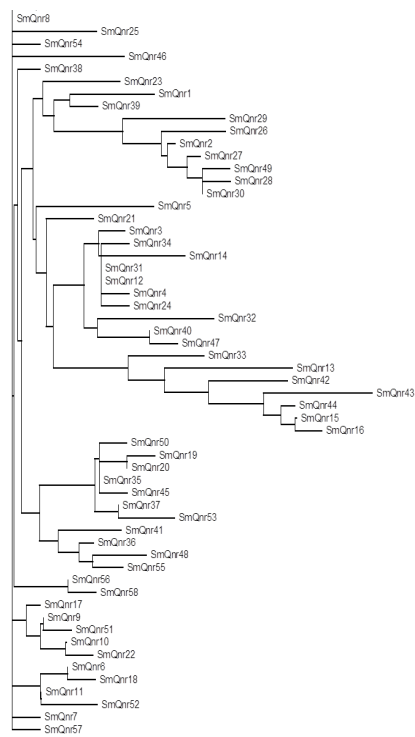


図 1. *Smqnr* の系統樹解析結果

*Smqnr* を保有する *S. maltophilia* の PFGE 解析結果を図 2 に示す。PFGE では耐性株の相同性を解析し、地域での流行株の拡散状況を検討した。*Smqnr* を保有する *S. maltophilia* は 21 種類の PFGE タイプに分類され、多様なクローンを認めた。

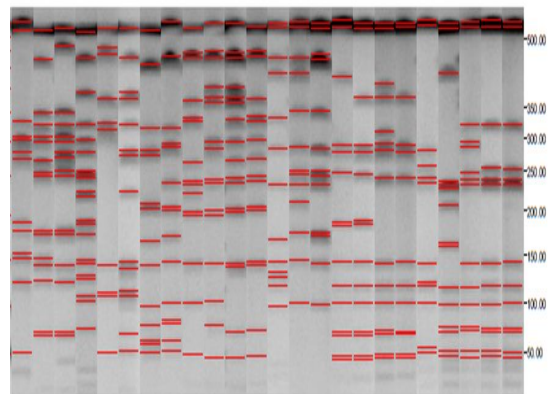


図 2. *Smqnr* を保有する *S. maltophilia* の PFGE 解析結果

*S. maltophilia* は腸内細菌へのキノロン耐性遺伝子の伝播における潜在的なリザーバーである可能性が示唆されており、本邦の *S. maltophilia* 臨床分離株において *Smqnr* が高頻度に検出されたことから、今後の動向に注意する必要がある。

## 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 6 件)

1. Kanamori H, Aso N, Tadano S, Saito M, Saito H, Uchiyama B, Ishibashi N, Inomata S, Endo S, Aoyagi T, Hatta M, Yamada M, Gu Y, Tokuda K, Yano H, Kunishima H, Hirakata Y, Saijyo T, Kitagawa M, Kaku M: Tuberculosis exposure among evacuees at a shelter after earthquake, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 査読有 19: 799-801, 2013. doi: 10.3201/eid1905.121137.
2. Yano H, Uemura M, Endo S, Kanamori H, Inomata S, Kakuta R, Ichimura S, Ogawa M, Shimojima M, Ishibashi N, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Yamada M, Tokuda K, Kunishima H, Kitagawa M, Hirakata Y, and Kaku M: Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates from *Escherichia coli* at a Japanese tertiary hospital. *PLoS One* 査読有 8: e64359, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0064359.
3. Kanamori H, Uchiyama B, Hirakata Y, Chiba T, Okuda M, Kaku M: Lessons learned from a tuberculosis contact investigation associated with a disaster volunteer after the 2011 Great East Japan Earthquake. *Am J Respir Crit Care Med* 査読有 187: 1278-1279, 2013. doi: 10.1164/rccm.201212-2150LE.
4. Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, Hirotsu A, Arai K, Endo S, Ichimura S, Ogawa M, Shimojima M, Aoyagi T, Hatta M, Yamada M, Gu Y, Tokuda K, Kunishima H, Kitagawa M, Kaku M: Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and *qnr* determinants in *Enterobacter* species from Japan. *PLoS One* 査読有 7: e37967, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0037967.
5. Yano H, Ogawa M, Endo S, Kakuta R, Kanamori H, Inomata S, Ishibashi N, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Yamada M, Tokuda K, Kunishima H, Kitagawa M, Hirakata Y, Kaku M: High frequency of IMP-6 among clinical isolates of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 査読有 56: 4554-4555, 2012. doi: 10.1128/AAC.00617-12.
6. Kanamori H, Weber DJ, Sickbert-Bennett EE, Brown V, Kaku M, Rutala WA: Descriptive analysis of healthcare-associated infections other than bloodstream, respiratory,

urinary tract, or surgical site infections, 2001-2011. *Infect Control Hosp Epidemiol* 査読有 33: 1276-1278, 2012. doi: 10.1086/668423.

[学会発表](計 4 件)

1. 金森肇、田内絢子、矢野寿一、遠藤史郎、小川美保、霜島正浩、賀来満夫：本邦における *Stenotrophomonas maltophilia* の *Smqnr* に関する検討、第 25 回日本臨床微生物学会総会、2014 年 2 月 1 日、名古屋
2. Kanamori H, Nagasawa M, Endo S, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Tokuda K, Yano H, Kaku M. Role of Clinical Laboratory Test and Lessons Learned from Infection Control and Prevention in the Affected Area. The 7th Asian Conference on Emergency Medicine, October 25, 2013, Tokyo
3. Kanamori H, Aso N, Uchiyama B, Saito H, Hirakata Y, Kaku M. Clinical Characteristics of Active Pulmonary Tuberculosis after the 2011 Great East Japan Earthquake. IDWeek2013. October 5, 2013, San Francisco, USA
4. Kanamori H, Tokuda K, Inomata S, Saito M, Ikeda S, Yano H, Kunishima H, Kitagawa M, and Kaku M: Application of phage open-reading frame typing to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak investigations in a Japanese tertiary care hospital. 8th International Healthcare Infection Society (HIS) Conference and Federation of Infection Societies (FIS) annual conference. November 19, 2012, Liverpool, UK

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金森 肇 (KANAMORI, HAJIME)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号：70625318