

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462512

研究課題名(和文) 尿路感染症分離菌におけるカルバペネマーゼ産生菌の研究

研究課題名(英文) Research for urinary tract infection-causative carbapemase-producing bacteria

研究代表者

重村 克巳 (Shigemura, Katsumi)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・病院講師

研究者番号：00457102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：クラスBカルバペネマーゼ産生菌として知られるメタロ βラクタマーゼ：MBL産生株は全CREのうち84.6%であり、全株でIMP-6型を示した。また腸内細菌科以外のカルバペネム耐性菌としては、カルバペネム耐性緑膿菌ではMBL産生菌は76.4%を占めていた。またカルバペネマーゼ別ではIMP型85.7%(IMP-1型55.6%、IMP-7型44.4%)、VIM型9.5%(4/42株)であった。また疫学分析としてrep-PCR法にてextended-spectrum β-lactamases：ESBL産生大腸菌72株は18グループに分類された。今後この解析をカルバペネマーゼ産生菌に応用していく。

研究成果の概要(英文)：Production of metallo-beta-lactamase (MBL) which is known as a class B carbapenemase-producing bacteria were investigated and MBL occupied 84.6% in all CRE strains. All the bacteria were categorized as IMP-6 by sequencing. As to the bacteria other than Enterobacteriaceae, MBL producing bacteria occupied 76.4% in all the carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and sequencing data showed that IMP type was in 85.7% (IMP-1 type: 55.6% and IMP-7 type: 44.4%) and VIM type was 9.5%. Regarding epidemiological analysis, repetitive extragenic palindromic sequence (rep)-PCR data showed that 72 strains of extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* were categorized into 18 groups. The reproducibility of this method using ESBL producing strains may lead to further application for carbapenemase-producing bacteria.

研究分野：腎泌尿器科学

キーワード：尿路感染症

1. 研究開始当初の背景 尿路感染症の薬剤耐性菌について

尿路感染症領域ではその原因菌、薬剤感受性は変化しており(Shigemura et al. Urol Int, 2012; Shigemura et al. Jpn J Infect Dis, 2005) 主に問題となっている耐性菌としてはキノロン耐性大腸菌(Shigemura et al. J Infect Chemother, 2008) ペニシリン系(Shigemura et al. J Infect Chemother, 2006) や多剤耐性緑膿菌、キノロン耐性腸球菌(Shigemura et al. J Clin Microbiol, 2011)、キノロン耐性緑膿菌(Shigemura et al. J Clin Microbiol, 2011)、また尿路のみならずメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)(Shigemura et al. Int J Antimicrob Agent, 2012) が挙げられる。同時にラクタム系抗菌薬の中で、基質特異性拡張型ラクタマーゼ(ESBL)産生菌の増加(Shigemura et al. J Infect Chemother, 2011) やカルバペネム系抗菌薬のみに有効である細菌の増加を認めている。この背景の中でカルバペネム系抗菌薬に対しほぼ100%の感受性を有していた尿路感染症の主要な原因菌である腸内細菌においてメロペネムなどのカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す菌株が出現してきており、当院でも同様の傾向がみられている。この種の菌株は上記の耐性菌と違って全く有効な抗菌薬を持たない可能性が大であり、その感染症が蔓延した場合には院内のみならず、市中感染から大きな健康被害が及ぼされる。

カルバペネマーゼについて

カルバペネム系抗菌薬は、このESBL産生腸内細菌感染症の治療に最も多く用いられるため、カルバペネム系抗菌薬を同時に不活化するカルバペネマーゼ産生菌が出現すると治療選択肢がほとんどなくなることになる。カルバペネム系抗菌薬を不活化するクラスBラクタマーゼは、腸内細菌科内において広まりつつある。カルバペネマーゼは、ペ

ニシリン系抗菌薬、セファロスポリン系抗菌薬、モノバクタム、ならびにイミペネムおよびメロペネムを加水分解する。クラスAカルバペネマーゼはクラブラン酸およびタゾバクタムにより阻害されると言われているが実際の臨床の現場においては効果を示さないことが多く、一度感染してしまうと容易に特に易感染状態である患者を中心に蔓延する恐れがあり、注意が必要である。同時にこのタゾバクタムの頻用がカルバペネマーゼ産生のリスクファクターの一つになっている。

これらの観点により、尿路感染症治療においてこの耐性菌株を迅速に同定する方法を開発することは無効な抗菌薬投与を避け、さらなる多剤耐性化の助長の抑制につながる。特に尿路性敗血症を引き起こしうる複雑性尿路感染症の診断、治療において重要である。同時にこれら菌株の相同性を調べ、疫学ならびに伝播経路の調査を行うことは、近年その重要性が再認識されつつある院内感染予防対策強化の啓発にも通じる。すなわち院内医療職員に重要な耐性菌の出現、伝播の現況を各種委員会、ワーキンググループ活動を介して通知し、院内感染を「人為的に伝播惹起させない」接触感染予防策等遵守の努力を啓発したい。

2. 研究の目的

尿路感染症の薬剤耐性機構は様々であり、申請者はこれまで主たる原因菌である腸内細菌についてキノロン系、ペニシリン系薬耐性機構、その迅速診断についての研究を重ねてきたが、それらはいずれもほかに治療法がまだ残るものであった。本研究では近年増え続けているカルバペネム系抗菌薬も効果を示さない、すなわち治療法のない可能性の高いカルバペネマーゼ産生菌について尿路感染症由来腸内細菌における分離状況を調べ、同産生株の迅速診断法の確立を図る。さらに分離菌の相同性を確認し、伝播経路を分析し、結

果を院内に通知し、院内感染対策をより強化する。これらにより多剤耐性菌の誘発、蔓延を助長させる不適切な抗菌薬使用を食い止め、さらにプラスミド性に他菌に伝播することを防ぎ、高度耐性菌の蔓延を妨げ、人類の健康を守る、こととした。

3. 研究の方法

神戸大学医学部附属病院および関連施設より、尿路感染症由来の大腸菌、クレブシエラ、プロテウスなど腸内細菌のうち、カルバペネム系抗菌薬のイミペネムあるいはメロペネム耐性株を収集し、薬剤感受性試験²²⁾、カルバ NP テスト、変法ホッジテストにて、カルバペネマーゼ産生菌の同定を行う。

菌株より DNA を抽出し PCR を行い、クラス A (GES、KPC、SME、IMI/NMC-A)、クラス B (NDM、IMP、VIM)、クラス D (OXA-48) のカルバペネマーゼ関連遺伝子保有ならびに型分類を行う。

カルバペネマーゼ産生株同種間の相同性を見る疫学的調査として、自動細菌タイピング装置である Diversilab を用いた rep-PCR 法、系統樹作成を行い、同種菌株内の耐性菌の伝播様式を推定する。さらなるゲノムタイピング識別法として multilocus sequence typing: MLST により、では菌株毎に複数遺伝子の配列の差異をパターン化して (alleles に分別) それらを統合遺伝子解析ソフトにより総合的に解析する。

4. 研究成果

MBL 産生腸内細菌

今回、Meropenem: MEPMのminimal inhibitory concentration: MIC値が2 µg/mL以上または Imipenem: IPM 2 µg/mL以上かつcefmetazole: CMZ 64 µg/mL以上の株を今回検討対象とした。解析可能であった株は26株であり、その内訳は大腸菌8株、肺炎桿菌が18株であった。まず

変法ホッジテスト法にてKPCあるいはMBL産生性、あるいはSMA法にてMBL産生性の確認を行った。PCRの結果、22/26株(84.6%)は全てblaIMP陽性となった。また、blaKPC陽性は大腸菌のみにみられ、25%(2/8株)であった。blaIMP陽性株はイミペネム(IPM)耐性が27.7%(6/22株)、メロペネム(MEPM)耐性が100%(22/22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、blaIMP陽性株のうち、キノロン系薬剤に耐性を示した株は88.2%(20/22株)となり、blaIMP陰性株と比較して耐性の割合が高い傾向にあった。さらにシーケンスの結果、blaIMP陽性株は全てIMP-6型MBLであり、肺炎桿菌では77.8%(14/18株)、大腸菌100%(8/8株)であった。よりそり詳細なゲノム解析としてのMLSTでは、IMP-6型MBL産生株は、肺炎桿菌では78.6%(11/14株)がST37、大腸菌では全ての株が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。今後さらなる解析が待たれる。

大腸菌

上述した rep-PCR 法の解析のため、まず ESBL 産生大腸菌を用いて、ゲノムタイピング、血清型を判別した。解析し、評価可能であった 72 株を検討した。全株が blaCTX-M 陽性であり、そのうち 22 株(30.6%)が CTX-M-1 group に分類され、9 株(12.5%)の CTX-M-15 を含んでいた。あとの内訳は 3 株(4.2%)が CTX-M-2 group, 47 株(65.3%)が CTX-M-9 group であった。これら菌株を用いて Diversilab を用いた rep-PCR 法にて ESBL 産生大腸菌 72 株は 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。

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 5 件)

Mukai S, Shigemura K, Nomi M, Sengoku A, Yamamichi F, Fujisawa M, Arakawa S.

Retrospective study for risk factors for febrile UTI in spinal cord injury patients with routine concomitant intermittent catheterization in outpatient settings. Spinal Cord. 2016;54(1):69-72.

Osawa K, Shigemura K, Shimizu R, Kato A, Kusuki M, Jikimoto T, Nakamura T, Yoshida H, Arakawa S, Fujisawa M, Shirakawa T.

Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli in a university teaching hospital. Microb Drug Resist. 2015;21(2):130-9.

Shigemura K, Osawa K, Kato A, Tokimatsu I, Arakawa S, Shirakawa T, Fujisawa M. Association of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa strains clinically isolated from urinary tract infection patients. J Antibiot (Tokyo). 2015;68(9):568-72.

Osawa K, Shigemura K, Shimizu R, Kato A, Kimura M, Katayama Y, Okuya Y, Yutaka S, Nishimoto A, Kishi A, Fujiwara M, Yoshida H, Iijima Y, Fujisawa M, Shirakawa T. Antimicrobial resistance in Salmonella strains clinically isolated in Hyogo, Japan (2009-2012). Jpn J Infect Dis. 2014;67(1):54-7.

Takaba K, Shigemura K, Osawa K, Nomi M, Fujisawa M, Arakawa S.

Emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli in catheter-associated urinary tract

infection in neurogenic bladder patients. Am J Infect Control. 2014;42(3):e29-31.

〔学会発表〕(計 5 件)

重村克巳

薬剤耐性菌を考慮した抗菌薬治療とは?

第88 回日本感染症学会・第62回日本化学療法学会合同学術講演会(招待講演)

2014 年6 月18日~2014 年6 月20日 ヒルトン福岡シーホーク(福岡)

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 β -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18 日~2014 年6 月20 日
ヒルトン福岡シーホーク(福岡県)

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
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18日~2014 年6 月20日 ヒルトン福岡シーホーク(福岡)

重村克巳

グラム陰性桿菌感染症の臨床像と治療
第216 回 ICD 講習会

2015 年10 月15日 奈良春日野国際フォーラム(奈良)

Shigemura K, Osawa K, Tanaka K, Nakano Y, Shirakawa T, Arakawa S, Fujisawa M.

Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli isolated urinary tract infection in a university teaching hospital. AUA Annual Meeting 2016. 2016年05月06日~2016年05月10日. San Diego Convention Center (San Diego, USA)

(1)研究代表者

重村 克巳 (SHIGEMURA, Katsumi)
神戸大学大学院医学研究科腎泌尿器科学
分野 病院講師
研究者番号：00457102

(2)研究分担者

荒川 創一 (ARAKAWA, Soichi)
神戸大学大学院医学研究科腎泌尿器科学
分野 特命教授

研究者番号：70159490

(3) 研究分担者

田中 一志 (TANAKA, Kazushi)
神戸大学大学院医学研究科腎泌尿器科学
分野 特命教授

研究者番号：20335433