

結核菌の薬剤耐性(台湾 CDC)
NDM-1 型薬剤耐性菌(ベトナム NIHE)

研究分担者 柴山 恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部)

研究要旨

これまでに台湾で分離された INH 耐性結核菌で、既存の耐性検出用 DNA プローブに含まれていない変異で、かつ耐性との関連が明らかにされていない変異 *ahpC* の C-10T、*KatG* の Y337C、*Ndh* の I68T を持つ株を複数見出した。今後感染研にて、これらの変異蛋白の機能を解析し、実際に耐性に関与しているかどうかを解析する。そして INH 耐性結核菌を検出する検査法の改良を目指す。台湾を始めアジア各国で結核罹患率の高い国で薬剤耐性結核の迅速診断に役立つことが期待される。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、日本においてはこれまで 6 例報告があるのみだが、ベトナムにおいては医療機関で頻繁に分離されている。ベトナムで分離された NDM 遺伝子陽性 *Acinetobacter baumannii* 株 1 2 株の MLST 型を調べたところ、全てが、世界的に流行タイプとして知られている CC-92 とは異なるタイプだった。院内感染に関する対策が十分でないことが背景として考えられる。日本国内においては、途上国に旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に入院する患者について、特に NDM 型のような外国で蔓延している耐性菌について注意を払う必要があると考えられる。

研究協力者

森 茂太郎 (国立感染症研究所・細菌第二部)
金 玄 (国立感染症研究所・細菌第二部)
松井 真理 (国立感染症研究所・細菌第二部)
鈴木 仁人 (国立感染症研究所・細菌第二部)
鈴木 里和 (国立感染症研究所・細菌第二部)
和知野純一 (名古屋大学医学部・細菌学)

A. 研究目的

薬剤耐性結核菌は世界の深刻な社会問題の一つである。治療薬であるイソニアジド(INH)に対する耐性菌はよく分離されるが、耐性は *katG*、*ndh* などの遺伝子の変異による。これらの変異を標的とした DNA プローブによる迅速検出法が実用化されているが、台湾 CDC では、その DNA プローブに含まれない変異を持つ耐性株が分離されている。台湾 CDC との共同研究では、台湾 CDC で見いだされたこれらの変異が実際に耐性に関与しているかどうかを感染研で解析することとした。

NDM 型耐性菌は、2010 年にインド、パキスタンで見いだされてから世界中に拡散している。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、日本においてはこれまで 6 例報告があるのみだが(Table 1)、ベトナムにおいては医療機関で頻繁に分離される。発展途上国では医療機関だけでなく環境中にも蔓延していることが報告されている。ベトナム NIHE との共同研究では、ベトナムにおける NDM 型耐性菌の実態について分子疫学的に調査することとした。ベトナムの医療機関で分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生株について、感染研において遺伝子型別を行う

こととした。

B. 研究方法

台湾 CDC においては、INH 耐性結核菌を収集し、*ahpC*、*katG*、*ndh* 遺伝子の変異を調べ、過去に報告がないものを選び出した。

ベトナム NIHE においては、医療機関からカルバペネム耐性菌を収集し、PCR により NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子をスクリーニングした。今年度は *Acinetobacter baumannii* に焦点を当てて、感染研で Multilocus sequence typing (MLST)により遺伝子型別を行った。また、感染研で考案した SMA ディスクによるカルバペネマーゼ産生菌の迅速検出法が NDM 型耐性菌にも応用できるかどうか、評価を行った。

倫理面への配慮 該当なし。

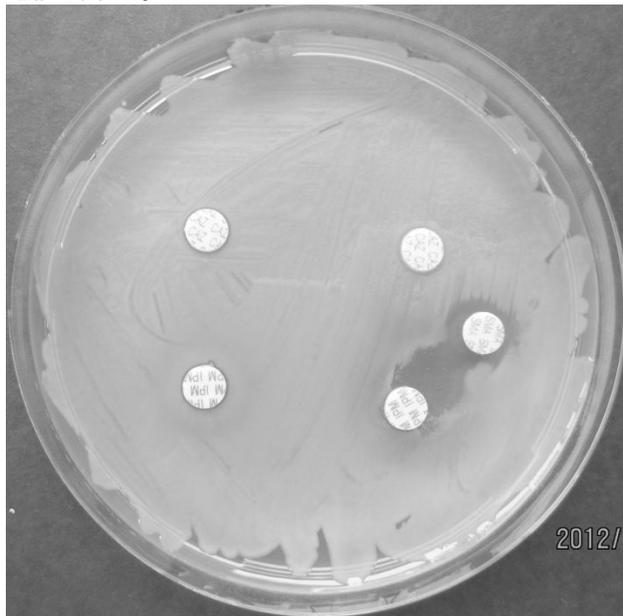
C. 研究結果

台湾 CDC で収集した結核菌で、INH 耐性のものについて遺伝子の変異のスクリーニングを実施し、過去に耐性との関連が証明された変異部位以外の変異を持つものについて、情報を蓄積した。*ahpC* 遺伝子の C-10T、*KatG* の Y337C、*ndh* の I68T の変異を持つ株を複数見出した。今後感染研にて、これらの変異蛋白の機能を解析し、実際に耐性に関与しているかどうかを解析する。感染研にて遺伝子をクローニングして大腸菌で発現させ、リコンビナント蛋白を作成して機能解析を行い、変異により活性がどのように変化しているのか、またその変化が薬剤耐性と相関するかどうかを調べることにした。さらに、遺伝子に既知の変異を持たない耐性株も複数分離されたので、耐性を再度確認後、菌を感染研に送

付してもらい、ゲノム解析を行うこととした。

ベトナムハノイ市内の医療機関でNDM型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* を12株分離した。これらの株からDNAを抽出し、感染研にてMLSTにより型別を行った。*A. baumannii* は、MLSTにより世界的な流行タイプCC-92とそれ以外のものに分けられる。CC-92は、多剤耐性のことが多く、また特に院内感染を起こしやすいという特徴がある。日本国内で院内感染によるアウトブレイクを起こすのは、ほとんどの場合CC-92タイプである。ベトナムで分離されたNDM産生株12株のMLST型を調べたところ、全てnon-CC-92タイプだった。また、NDMを持たない *A. baumannii* 11株も同時に解析したところ、2株がCC-92で、9株はno-CC-92タイプだった(Table 2)。また、同一医療機関から分離された株でも、タイプが異なっていた。

感染研で考案されたSMAディスクによるメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌検出法をNDM型耐性菌に応用したところ、*Acinetobacter* だけでなく、大腸菌、*Klebsiella*、その他腸内細菌において問題なく使用出来ることが分かった。例を示す。NDM陽性の *A. baumannii* ではセフトチジム(CAZ)とイミペネム(IPM)では阻止円が形成されないが、SMAディスクをおく事によりIPMディスクに阻止円が形成されることが分かった。株により、メロペネム(MPM)でもSMAディスクにより阻止円が形成されることが確認出来た。



D. 考察

結核菌のINH耐性株で、これまでに報告がない遺伝子の変異を見いだした。これらが実際に耐性に関与していることが明らかになれば、現行のINH耐性結核菌を検出する検査法の改良につなげられる。

NDM型耐性菌については、日本ではまだ稀であるものの、ベトナムでは医療機関で蔓延状態にあることが分かった。これらの株は、流行タイプCC-92ではなかった。カルバペネム耐性のこれらの非流行タイプの株が頻繁に分離されるということは、医療

機関における院内感染対策が十分でないことを意味するだろう。ベッドは、複数の患者が共有しているようであるし、グローブや予防衣の着用なども十分にされていないようなので、一旦耐性菌が病棟に持ち込まれると速やかに院内に拡散し、蔓延してしまうと考えられる。また、市中の薬局で処方箋なしで抗菌薬が購入出来るので、国民は比較的頻繁に抗菌薬を服用しているようである。このようなことも、耐性菌を社会で拡散させる一因であると考えられる。

E. 結論

台湾CDCでINH耐性結核菌において新たな遺伝子変異を見いだした。

ベトナムで分離されたNDM型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* は、全て非流行タイプだった。このタイプは、仮に日本国内に持ち込まれても通常の感染対策がしっかりと実施されていれば、大きな院内感染を起こす可能性は低いが、海外渡航歴のある患者を受け入れる場合には注意を払う必要があると考えられる。

F. 健康危機情報

途上国を旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に入院する患者については、特にNDM型のような外国で蔓延している耐性菌について注意を払う必要がある。

G. 研究発表

- 1) Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.
Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT. *J. Clin. Microbiol.* 2013 Jan;51(1):373-4.
- 2) わが国におけるNDM型およびKPC型カルバペネマーゼ産生菌分離状況、2012年現在。
鈴木里和 松井真理 鈴木仁人 甲斐久美子 吉村由美子 瀧世志江 柴山恵吾
病原体微生物検出情報(IASR) 34(1):8-9, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

Table 1.

No.	Year	Bacterial species	Overseas travel history	Laboratory
1	2010	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	None	NIID
2	2010	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	None	NIID
3	2011	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	India	NIID
4	2011	<i>Escherichial coli</i>	India	Dokkyo University
5	2012	<i>Acinetobacter baumannii</i>	India	Toho University
6	2013	<i>Escherichial coli</i>	Bangladesh	Teikyo University and NIID

Table 2.

NIID No.	NIHE No.	NDM-1 (477bp)	Hospital	species identification (by <i>rpoB</i> sequence)	NIID data												
					PCR					MLST							
					NDM-1 PCR in NIID	OXA-51-like	OXA-23-like	OXA-58-like	OXA-24-like	<i>gltA</i> (722bp)	<i>gyrB</i> (909bp)	<i>gdhB</i> (775bp)	<i>recA</i> (425bp)	<i>cpn60</i> (479bp)	<i>gpi</i> (400bp)	<i>rpoD</i> (926bp)	Sequence Type
1	271	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
2	275	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
3	282	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	1	54	80	28	1	novel2	45	novel 2
4	303	+	V	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	1	81	11	48	18	24	43	302
5	320	+	T	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	-	-	1	81	11	48	18	24	43	302
6	327	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
7	340	+	T	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	22	15	13	12	4	62	2	91
8	351	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
9	357	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
10	393	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	33	12	120	10	32	56	5	novel 3
15	650	+	S	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	+	-	18	34	novel1	6	4	novel1	50	novel 1
16	821	+	V	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	-	-	33	12	59	11	32	124	5	novel 4
17	856	+	V	<i>A. baumannii</i>	+	+	-	-	-	1	15	3	2	2	3	3	novel 5
19	36	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	3	3	2	2	7	3	92
20	40	-	T	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	1	13	2	4	84	2	novel 6
21	42	-	T	<i>A. baumannii</i>	-	+	-	-	-	1	1	13	12	4	16	2	novel 7
24	76	-	S	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	10	12	4	11	4	9	5	109
25	77	-	S	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	1	13	12	4	84	2	novel 8
26	89	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	3	3	2	2	96	3	195
27	93	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	22	15	13	12	4	62	2	91
28	94	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	1	13	12	4	84	2	novel 8
29	95	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	1	13	12	4	84	2	novel 8
30	103	-	V	<i>A. baumannii</i>	-	+	+	-	-	1	3	3	2	2	7	3	92