

201225060A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び

薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

(H24-新興-一般-010)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 柴山恵吾

平成 25 年(2013 年) 3 月

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

「新型薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び

薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究」班 名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	柴山恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部	部 長
研究分担者	荒川宜親	名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原微生物学／耐性菌制御学	教授
	飯沼由嗣	金沢医科大学臨床感染症学	教授
	大西 真	国立感染症研究所細菌第一部	部長
	北島博之	地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター 新生児科	部長
	切替照雄	独)国立国際医療センター研究所 感染制御研究部	部長
	黒崎博雅	熊本大学大学院生命科学研究部	准教授
	佐多徹太郎	富山県衛生研究所	所長
	鈴木里和	国立感染症研究所細菌第二部	主任研究官
	舘田一博	東邦大学医学部微生物・感染症学講座	教授
	富田治芳	群馬大学大学院医学系研究科細菌学	教授
	長沢光章	東北大学医学部附属病院診療技術部	部長
	藤本修平	東海大学医学部基礎医学系生体防御学	教授
	松本智成	地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センタ ー臨床研究部	部長
	山根一和	川崎医科大学公衆衛生学	講師
山本友子	千葉大学大学院薬学研究院	教授	

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究協力者	森茂太郎	国立感染症研究所細菌第二部	室長
	林原絵美子	国立感染症研究所細菌第二部	研究員
	金 玄	国立感染症研究所細菌第二部	研究員
	松井真理	国立感染症研究所細菌第二部	研究員
	鈴木仁人	国立感染症研究所細菌第二部	研究員
	見理 剛	国立感染症研究所細菌第二部	主任研究官
	久保田眞由美	国立感染症研究所細菌第二部	主任研究官
	筒井敦子	国立感染症研究所細菌第二部	非常勤職員
	山岸拓也	国立感染症研究所感染症情報センター	主任研究官
	網中眞由美	国立感染症研究所細菌第二部	非常勤職員
	涌井 拓	国立感染症研究所感染症情報センター	研究生
	太田美智男	椙山女学園大学看護学部	教授
	川村久美子	名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学	准教授
	横山佳子	京都女子大学家政学部食物栄養学科	准教授
	谷原真一	福岡大学医学部衛生・公衆衛生学	准教授
	長野則之	船橋市立医療センター微生物検査室	主任検査技師
	平木洋一	独立行政法人国立病院機構 熊本医療センター薬剤科	副薬剤科長
	木村幸司	名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原微生物学／耐性菌制御学	講師
	和知野純一	名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原微生物学／耐性菌制御学	助教



区 分	氏 名	所 属	職 名
研究分担者の 研究協力者	山田景子	名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原微生物学／耐性菌制御学	助教
	横山 覚	名古屋大学大学院医学系研究科	
	中根邦彦	名古屋大学大学院医学系研究科	
	長野由紀子	国立感染症研究所細菌第二部	協力研究員
	外山雅美	船橋市立医療センター微生物検査室	主任検査技師
	鈴木匡弘	愛知県衛生研究所細菌検査室	主任研究員
	馬場尚志	金沢医科大学臨床感染症学	准教授
	小川道永	国立感染症研究所細菌第一部	室長
	常 彬	国立感染症研究所細菌第一部	主任研究官
	早川昌弘	名古屋大学医学部附属病院周産母子センター	教授
	大木康史	群馬大学周産母子センター	講師
	大城 誠	名古屋第一赤十字病院小児保健科	副部長
	森岡一朗	神戸大学医学部小児科周産母子センター 新生児病棟	医長
	堀越裕歩	東京都立小児総合医療センター感染症科	
	山田恭聖	愛知医科大学小児科	医長
	坂木晴世	国立病院機構西埼玉中央病院医療安全管理室	
	秋山 徹	(独)国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部	室長
	多田達哉	(独)国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部	研究員

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究分担者 の 研究協力者 (続き)	島田佳世	(独)国立国際医療研究センター研究所 感染症制御研究部	研究補助員
	霜島正浩	(株)BML 総合研究所検査本部	次長
	山口佳宏	熊本大学環境安全センター	准教授
	綿引正則	富山県衛生研究所細菌部	主幹研究員
	清水美和子	富山県衛生研究所	
	八柳 潤	秋田県健康環境センター	主任研究員
	石井良和	東邦大学医学部微生物感染症学講座	講師
	谷本弘一	群馬大大学大学院薬剤耐性菌実験施設	准教授
	犬塚和久	JA 愛知厚生連安城更生病院臨床検査技術科	
	郡 美夫	東京医学技術専門学校	
	堀 光広	岡崎市民病院臨床検査室	臨床検査室長
	静野健一	千葉市立海浜病院臨床検査科	
	柳沢英二	(株)ミロクメディカルラボラトリー	
	大花 昇	福島県立医科大学附属病院検査部	検査技師長
	村上啓雄	岐阜大学医学部附属病院生体支援センター	センター長
	八束眞一	医療法人社団日高会日高病院 臨床検査室	技師長
	都倉昭彦	北杜市立塩川病院	病院長
	輿石芳夫	北杜市立塩川病院 臨床検査科	臨床検査技師
	本間 操	都立松沢病院検査科臨床検査室	臨床検査技師

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究分担者 の 研究協力者 (続き)	高柳美伊子	筑波メディカルセンター病院診療技術部 臨床検査科	科長
	静野健一	千葉市立海浜病院臨床検査科微生物検査室	検査技師
	高屋 明子	千葉大学大学院薬学研究院	准教授
	佐藤慶治	千葉大学大学院薬学研究院	助教

## 目 次

### I. 総括研究報告書

- 新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び  
薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究 ..... 1  
柴山恵吾 国立感染症研究所

### II. 分担研究報告書

1. 薬剤耐性菌の分子疫学及び耐性機構に関する研究 ..... 4  
柴山恵吾 国立感染症研究所
- 1) *Acinetobacter baumannii* 流行株スクリーニング方法の検討と分子疫学解析
  - 2) 抗結核薬ピラジナミドと NAD 代謝経路
  - 3) *Helicobacter cinaedi* の分子疫学と薬剤耐性
  - 4) 薬剤耐性菌における同種異種間の相互作用
2. 新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 ..... 15  
荒川 宜親 名古屋大学大学院医学系研究科
- 1) 新型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ SMB-1 の構造と機能に関する研究
  - 2) OXA-48 を産生する新型耐性菌に関する研究
  - 3) 免疫蛍光抗体法による  $\beta$ -lactamase 産生菌迅速検出法の構築
  - 4) 健常人腸管内における基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の  
長期継続保菌に関する研究
  - 5) ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌に関する研究
  - 6) 黄色ブドウ球菌の薬剤耐性に関する研究
3. RE、MDRP 等の伝播様式と蔓延防止に関する研究 ..... 37  
飯沼 由嗣 金沢医科大学
4. 肺炎球菌の薬剤耐性に関する研究 ..... 43  
(日本国内の小児侵襲性感染症由来  $\beta$ -ラクタム剤非感受性肺炎球菌の解析)  
大西 真 国立感染症研究所

5. NICU および一般総合病院産科新生児病棟における  
 院内感染症防止方法の検討 …………… 47  
 (新生児における病院感染症の予防あるいは予防対策に関する研究)  
 北島 博之 大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター  
 (資料) 全国の総合病院における産科混合病棟と母子同室の状況について  
 (資料) Handbook for Prevention of  
 Healthcare Associated Infections in NICU
6. 多剤耐性緑膿菌に関する研究 ……………79  
 (多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究)  
 切替 照雄 独立行政法人国立国際医療センター研究所
7. 新型の薬剤耐性菌の構造・機能解析と立体構造に立脚した  
 検出剤の分子設計並びに迅速・簡便検査法の確立 …………… 87  
 (メタロ-β-ラクタマーゼの構造機能解析と阻害剤の分子設計)  
 黒崎 博雅 熊本大学大学院生命科学研究部
8. 薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析技術の  
 向上に関する研究…………… 97  
 佐多 徹太郎 富山県衛生研究所  
 1) 地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する  
 細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究  
 2) アシネトバクター属菌の感染疫学解明に関する研究
9. JANIS サーベイランスデータの還元情報・公開情報の  
 あり方について ……………110  
 鈴木 里和 国立感染症研究所  
 1) JANIS データを利用した我が国の薬剤耐性菌の疫学解析に関する研究  
 2) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業手術部位感染  
 (Surgical site infection: SSI) 部門のデータを用いた腎臓手術に  
 関する SSI 発生率層別化の検討  
 3) 我が国における髄液由来 *Haemophilus influenzae* 分離症例数の推移  
 4) 診療報酬明細書 (レセプト) を用いた感染症サーベイランスの  
 評価について



10. 多剤耐性菌のベータラクタマーゼの解析 ( <i>Acinetobacter</i> 属菌が産生する OXA-型カルバペネマーゼの 検出法の構築に関する研究) .....	149
館田 一博 東邦大学医学部	
11. グラム陽性菌(腸球菌、黄色ブドウ球菌)の多剤耐性菌に関する研究 .....	152
富田 治芳	
12. 日常検査における薬剤耐性菌の検出方法の確立および 薬剤感受性検査の精度管理に関する研究 .....	155
長沢 光章 東北大学医学部附属病院	
13. JANIS 事業の安定運用と改善及び院内感染対策の 高精度化を目的とした電子システムの研究 .....	164
(院内感染対策の高精度化を目的とした電子システムの開発と 応用に関する研究)	
藤本 修平 東海大学医学部	
(資料)耐性菌 条件/警告・案内定義 メッセージ 定義書	
14. 非結核性抗酸菌の分子疫学解析と薬剤耐性責任遺伝子変異の解析 .....	189
(抗酸菌の <i>omnilog</i> による測定法の確立に関する研究)	
松本 智成 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター	
15. 新型薬剤耐性菌の分子解析および JANIS 事業の向上に関する研究 .....	192
山根 一和 川崎医科大学	
1) フルオロキノロン耐性に関する研究	
2) 中小規模医療機関のサーベイランスに関する研究	
16. 肺炎球菌のケトライド耐性機構ならびに耐性伝搬機構 .....	202
山本 友子 千葉大学大学院薬学研究院	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	205
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	209

# I. 総括研究報告書

## 新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

研究代表者 柴山 恵吾 (国立感染症研究所・細菌第二部・部長)

世界では新たな薬剤耐性菌が次々と出現し、拡散している。この研究は、国内の医療現場における新型耐性菌の出現を捕捉し、その耐性機構を分子生物学的手法により解明して、これら薬剤耐性菌の検出法、分子疫学解析法を開発するとともに、サーベイランスをより充実させて、国内での薬剤耐性菌の実態を把握するとともに医療現場での感染対策の策定のための基礎情報を得ることを目的とする。また、薬剤耐性メカニズムに立脚して新薬開発も試みる。国内では、2013年2月の時点までにNDM型カルバペネマーゼ産生菌が6例、KPC型カルバペネマーゼ産生菌が6例、OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌が2例把握された。NDM型の2例以外は全て輸入例だった。海外、特に途上国への渡航者が現地の医療機関に入院し治療を受け、その後帰国して入院した場合は、NDM型等の新型耐性菌の保菌の可能性について留意する必要があると考えられる。また国内分離の多剤耐性緑膿菌から新型アミノグリコシド不活化酵素 AAC(6')-Iaj を、*Acinetobacter* spp. から新型カルバペネマーゼ TMB-2 を見いだした。バンコマイシン耐性腸球菌では、新型の *vanN* 遺伝子を国内産鶏肉から分離した。海外だけでなく、国内でも新たな耐性菌が出現していることが分かった。これまでに見いだした新型カルバペネマーゼのうち SMB-1 蛋白、KHM-1 蛋白について結晶化し、分子構造を解明した。今後新薬の開発が期待出来る。多剤耐性緑膿菌で同定したアミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Ib、*Acinetobacter* 属菌の OXA-型カルバペネマーゼ、フルオロキノロン耐性遺伝子 *qepA* については迅速検出法を確立した。薬剤耐性菌の分子疫学については、近年院内感染が問題となっている *Acinetobacter baumannii*、*Helicobacter cinaedi* について簡便な遺伝子型別法を確立した。今後臨床現場での応用が期待される。菌株収集に関しては、今年度は国立病院機構の86病院に協力頂き、各病院で分離された *Acinetobacter* 属菌を収集している。3月末までに500株-1000株程度が収集出来る見込みである。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)のデータベースを利用した研究では、インフルエンザ菌b型について、検査部門データの解析からヒブワクチンの導入に伴い髄液からの分離率が劇的に減少していることを明らかにした。肺炎球菌では、7価肺炎球菌コンジュゲートワクチンに含まれない型の株でペニシリンG低感受性の率が増加していることが分かった。サーベイランスについては、医療機関において重要な耐性菌が異常に集積していることを自動で捕捉する簡易アルゴリズムを開発し、また2DCM-webのepi-curve機能の改良を行った。また、JANISの参加医療機関が多様化してきたことに伴い、療養型病床中心の医療機関と急性期病床中心の医療機関で解析を層別化する必要があることが分かった。さらに、JANISで対象としていない200床以下の中小病院の実態を調査し、サーベイランスの導入法を検討した。薬剤耐性菌に関しては、今後も基礎研究とサーベイランス研究が連携し、社会的に重要な耐性菌を把握し、そしてそれに対する対策の策定に資する研究を進める必要がある。また、医療現場での実際の感染対策に関する研究とも連携し、薬剤耐性菌に関する研究を包括的に進めて行く必要がある。

## A. 研究目的

世界では新たな薬剤耐性菌が次々と出現し、拡散している。最近ではインド/パキスタン地域でニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ-1(NDM-1)を産生する多剤耐性腸内細菌が出現し、日本を含む世界各地に広がっている。その他、KPC型やOXA-48などの新型カルバペネマーゼを産生する多剤耐性肺炎桿菌や、OXA-型カルバペネマーゼを産生する多剤耐性アシネトバクター属菌等が海外で広がっている。日本

国内でもこれらを含む様々な新型多剤耐性菌が確認されている。この研究では、国内で分離される新型の多剤耐性菌が持つ薬剤耐性機構について分子/遺伝子レベルで詳細な解析を行なう。同時に国内の医療機関における感染症の発生状況を把握するための厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業のデータを利用して、国内における様々な薬剤耐性菌の分離状況の動向を疫学的に解析する。また、国内における薬剤耐性菌の効率的な捕捉方法や臨床

現場のためにさらに必要な新たなサーベイランスシステムの開発を目指す。

## B. 研究方法

国内の医療機関で分離されたカルバペネム耐性菌や、多剤耐性菌を収集し、どのような耐性メカニズムをもつのかを分子生物学的手法により解析した。そして、それらについて簡便、迅速な検出法、分子疫学解析法を開発した。また、耐性に関する酵素の構造機能解析を行い、新薬の開発も試みた。サーベイランスに関しては、JANIS データを利用して薬剤耐性菌及びインフルエンザ菌の髄液からの分離率の解析や、感染症発症のリスクファクターの解析をおこなった。また、サーベイランスにおいて耐性菌の集積を早期に捕捉し臨床現場で感染対策により効果的に活用出来るようにするためのシステムの構築を進めた。

### 倫理面への配慮

菌株の収集にあたり、患者の海外渡航歴など、患者情報も収集した場合は予め国立感染症研究所倫理委員会の承認を得た。

JANIS データを用いた研究は、統計法による利用申請を行い、承認を得て実施した。

## C. 研究結果

国内では、2013年2月の時点までにNDM型カルバペネマーゼ産生菌が6例、KPC型カルバペネマーゼ産生菌が6例、OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌が2例把握された。これらの症例はほとんどが海外の医療機関で治療を受け、帰国後入院した患者だった。その他、新型TMB-2型カルバペネマーゼ産生菌を分離した。

これらや、これまでに分離した耐性菌が持つ薬剤耐性機構について分子/遺伝子レベルで詳細な解析を行なった。この研究班でこれまでに見いだした新型カルバペネマーゼのうちSMB-1蛋白、KHM-1蛋白を結晶化し、分子構造を解明した。今後、検出法や新薬の開発が期待される。

B群レンサ球菌については、ペニシリン低感受性(PRGBS)の株が2011年で4.5%あり、これは同時にフルオロキノロンとマクロライドにも耐性を示すことが多いことが分かった。

多剤耐性緑膿菌からは2011年に分離された株から新規アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼAAC(6')-Iajを同定した。またこれまでに同定したアミノグリコシド耐性因子AAC(6')-Ib産生多剤耐性緑膿菌を迅速に診断するイムノクロマトキットを作成した。これと、AAC(6')-Iae産生多剤耐性緑膿菌のキットと併用することで、日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約8割が検出可能となった。

*Acinetobacter*属菌のOXA-型カルバペネマーゼについても、迅速かつ簡便な検出法を開発した。*Acinetobacter*属菌については、*gyrB*遺伝子をター

ゲットとしたLinePCR法、*rpoB*遺伝子の塩基配列を利用した菌種同定法を考案した。フルオロキノロン耐性では、最近同定した*qepA*遺伝子の簡便なLAMP法による検出法を確立した。

肺炎球菌では、近年出現しているテリスロマイシン耐性のメカニズムが、高発現*ermB*遺伝子の獲得であることが分かった。また7価肺炎球菌コンジュゲートワクチンに含まれる血清型の株ではペニシリンG低感受性の率の低下し、一方でワクチンに含まれない型の株ではペニシリンG低感受性の率が増加していた。

抗酸菌では、*Mycobacterium abscessus*、*Mycobacterium massiliense*について、市中感染株が院内感染株よりも亜硝酸ナトリウム、ならびに安息香酸ナトリウムに対して抵抗性が高いことが分かった。

バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)では、新型のVanN型VRE株(*Enterococcus faecium*)を国内産鶏肉から分離した。

薬剤耐性菌の分子疫学については、*Acinetobacter baumannii*の流行株を迅速簡便に区別する方法を確立し、また*Helicobacter cinaedi*については初めてMultilocus sequence typing法を確立し、Websiteを作成した。

近年*Acinetobacter*属菌による院内感染事例がしばしば発生し、報道発表もされている。JANIS情報では、メロペネム耐性が2011年で2.9%であり、耐性率は若干の上昇傾向にある。これらの状況を鑑み、今年度は、国立病院機構の86病院に協力頂き、各病院で分離された*Acinetobacter*属菌を送って頂いた。3月末までに500株-1000株程度が収集出来る見込みである。来年度以降、研究班の中でこれらの菌株を利用して研究を進める予定である。また、今後もJANIS情報などを参考にしながら、医療現場で問題となっている耐性菌を把握し、年替わりで研究が必要な菌種を収集する予定である。

薬剤耐性の分子生物学解析と同時に、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業のデータを利用して、国内における様々な薬剤耐性菌の分離状況の動向を疫学的に解析し、またそのデータを用いて院内感染を早期に捕捉するシステムの開発を進めた。

JANISデータを用いた研究では、インフルエンザ菌b型について、検査部門データの解析からワクチンの導入に伴い髄液からの分離率が劇的に減少していることが分かった。手術後感染(SSI)については、年齢、内視鏡、創分類、ASAスコア、手術時間がSSI発生のリスク因子である事が明確に示された。

JANISは、近年参加医療機関が増加し、参加機関の施設特性が多様化してきた。検査部門のデータの解析から、療養型病床中心の医療機関では急性期病床中心の医療機関と比べてMRSAの分離率が高い傾向にあることが分かった。これらの医療機関ではその特性に応じた院内感染対策を策定する必要であることが分かった。同時に、検査部門でデータを施設

間で比較するには、平均在院日数を指標として医療機関を層別化して行う必要があることが分かった。

また、医療機関でサーベイランス情報をよりよく活用出来るように、医療機関における菌の異常な集積を自動で捕捉する簡易アルゴリズムを開発し2DCM-webのepi-curve機能の改良を行った。さらに、JANISで対象としていない200床以下の中小病院の実態を調査し、サーベイランスの導入が可能か検討した。これらの医療機関でも薬剤耐性菌に関する意識が高く、検査システム上も導入が可能であることが分かった。NICUにおける感染予防対策に関しては、米国NHSNに準拠したNICUにおける新しい感染症診断基準作成し、「NICUにおける医療関連感染予防のためのハンドブック」として刊行した。

#### D. 考察

NDM型等、外国で蔓延している新型耐性菌の国内での分離は、海外、特に途上国への渡航者が現地の医療機関に入院し治療を受け、その後帰国して入院した例がほとんどだった。NDM型、KPC型、OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌は、国内では今のところ院内感染による拡散は把握されていない。しかしながら、過去に多剤耐性*Acinetobacter*は一部の医療機関で、海外の医療機関で入院歴があり、帰国後に入院した患者から持ち込まれ、院内で拡散した例がある。今後も新型耐性菌の流入、拡散には十分な注意を払う必要がある。また新型耐性菌は海外からだけでなく、国内でも出現しているので、幅広く継続的なモニタリングが必要である。

ところで新型の耐性菌だけでなく、既存の耐性菌についても、これまでに解析が十分に行われていないものについては、感染対策に必要な研究を進める必要がある。例えば、*H. cinaedi*のように、これまであまり知られておらず、近年院内感染を起こす事が分かって来た病原体については、国内での実態の把握や薬剤耐性についてさらなる情報の集積が必要である。その他、JANIS情報で国内での薬剤耐性菌の実態を確認しながら、国内で問題となっている耐性菌を把握し、感染対策に必要な基礎応用研究を進める必要がある。

サーベイランスシステムを医療現場の感染対策に効果的に活用するためには、サーベイランスでより迅速、正確に院内感染を捕捉し、分かりやすい形で現場に情報を還元することが必要である。この研究班では、医療現場へ提供する還元情報を改良するための研究を引き続き行う。実際に医療現場でサーベイランスデータを活用する方法については、他の担当研究班で検討されることであるが、その班と今後積極的に連携して、薬剤耐性菌に対する対策を基礎研究、サーベイランス、および医療現場での感染対策という軸で有機的に連携させ、研究を進めて行く必要がある。

#### E. 結論

海外で蔓延しているNDM型、KPC型、OXA-48型カ

ルバペネマーゼ産生菌などの新型耐性菌が国内に流入していることが確認された。以前より国内で出現してきている多剤耐性緑膿菌、*Acinetobacter*属菌、*H. cinaedi*などについては検出法や分子疫学解析法を考案した。同時に、新たなカルバペネマーゼは蛋白の結晶化及び構造解析を行い、阻害剤の開発を試みた。サーベイランスの研究ではJANISデータからインフルエンザ菌b型の髄液からの分離率が激減していることが明らかになった。また、サーベイランス結果を臨床現場の感染対策により効果的に生かすため、重要な耐性菌の異常集積を捕捉するシステムを構築した。

#### F. 健康危険情報

海外、特に途上国への渡航者が現地の医療機関に入院し治療を受け、その後帰国して入院した場合は、NDM型等の新型耐性菌を保菌していることがあるため、注意が必要である。

#### G. 研究発表

1. 論文発表 (代表者の関連のみ、分担者の分は各々の分担報告書に記載)

- 1) Rimbara E, Mori S, Matsui M, Suzuki S, Wachino J, Kawamura Y, Shen Z, Fox JG, Shibayama K. Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from seven hospitals in Japan. *J Clin Microbiol.* 2012 Aug;50(8):2553-60.
- 2) Suzuki S, Matsui M, Suzuki M, Sugita A, Kosuge Y, Kodama N, Ichise Y, Shibayama K. Detection of Tripoli metallo- $\beta$ -lactamase 2 (TMB-2), a variant of blaTMB-1, in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2013. In press.

2. 学会発表  
多数のため省略

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## II. 分担研究報告書



## 薬剤耐性菌の分子疫学及び耐性機構に関する研究

研究分担者 柴山 恵吾 （国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

この研究は、院内感染で問題となる薬剤耐性菌で、研究があまり進んでいない *Acinetobacter baumannii* と *Helicobacter cinaedi* について分子疫学解析手法を開発した。また薬剤耐性、病原性の解析を行った。結核菌については、新規薬剤の開発を最終目的として、ピラジナミドの作用メカニズムの解析を行った。*A. baumannii* は MLST タイプ ST2 が現在世界的に流行しているが、このタイプは多剤耐性のことが多く、病原性も強いいため注意が必要である。この研究で、*A. baumannii* の *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子配列で ST2 に特異的な配列領域 (nt106-108) を見出した。そしてパイロシーケンスによる ST2 の迅速検出系を構築した。また、近年の世界的な ST2 タイプの拡散には T6SS の役割が重要であったことが示唆された。*H. cinaedi* については MLST 法を確立した。また日本においては *H. cinaedi* はクラリスロマイシンおよびシプロフロキサシン耐性株が非常に多いことが分かった。ピラジナミドについては、結核菌のキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼが標的分子の一つであることが分かった。

## 研究協力者

森 茂太郎 （国立感染症研究所・細菌第二部）  
林原絵美子 （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）

## A. 研究目的

この研究は、院内感染で問題となる薬剤耐性菌で、研究があまり進んでいない *Acinetobacter baumannii* と *Helicobacter cinaedi* について分子疫学と耐性機構の解析を行った。また結核菌について、新規薬剤の開発を最終目的として、ピラジナミドの作用メカニズムの解析を行った。

*A. baumannii* は弱毒性のグラム陰性細菌で、2000年代から広範な抗菌薬に耐性を獲得した多剤耐性株が臨床検体から分離されるようになった。近年、世界の医療機関において多剤耐性アシネトバクターによる院内感染アウトブレイクが頻発しており、本邦の医療機関においても継続的に報告されてきている。MLST (multilocus sequence typing) による分子疫学的解析により、世界で急速に広がった多剤耐性株は、主に ST2 (sequence type 2) 型に分類される。日和見感染症ながらこのタイプはパンデミックを引き起こす。この研究で、より迅速・簡便な ST2 の識別法を開発することとした。同時に、このタイプがなぜパンデミックを起こしやすいのか、その分子メカニズムの解明を行うこととした。

*Helicobacter cinaedi* は動物や人の腸管に存在する *Helicobacter* 属菌の一つであり、人患者からの

感染例が近年よく報告されている。*H. cinaedi* が分離される患者は主に免疫不全患者であり、菌血症や腸炎の原因菌として血液や糞便から分離されることが多い。さらに近年、*H. cinaedi* による院内感染が疑われる事例も報告された。しかし、これまで *H. cinaedi* の分子疫学的解析は行われていない。そこで、本研究では *H. cinaedi* の分子疫学的解析法の確立を目的とし、Multilocus Sequence Typing (MLST) および Pulse field Gel Electrophoresis (PFGE) 法による解析を行った。さらに *H. cinaedi* の薬剤耐性分布についても報告がないことから薬剤感受性についても調査した。

結核菌については、多剤耐性菌に効果がある新規薬剤が求められている。抗結核薬の1つであるピラジナミド (PZA) はニコチンアミド (NAM) の構造類縁体であり、結核菌の菌体内に取り込まれた後に活性型のピラジン酸 [POA; ニコチン酸 (NA) やキノリン酸 (QA) の構造類縁体] に変換され、酸性条件下で抗菌活性を示すことが明らかにされている。しかしながら、標的部位を含めて詳細な作用機序については不明の点が多く残されている。この研究では、この薬剤の標的分子を同定し、作用メカニズムを明らかにして新規薬剤の開発に結びつけることを目的とした。

## B. 研究方法

*A. baumannii* の ST2 を 21 株、ST2 以外ものを 15 株用いて、*bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子配列を比較した。ST2 タイプが有する *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子特異的な領域を見出した。そして、その領域を SNP 解析に用いた。SNP の検出・解析は pyrosequencing 法にて行った。

ST2 タイプの病原性の解析は、タイプ VI 分泌機構に着目した。タイプ VI 分泌機構は隣接する細菌にエフェクタータンパク質を注入し、その菌を殺す機能を担っていることが分かっている。ST2 と ST2 以外のタイプのタイプ VI 分泌機構の比較を行った。この研究では *A. baumannii* のそれぞれの ST タイプの大腸菌に対する殺菌活性を測定した。

*H. cinaedi* の解析は、国内の 7 医療機関で人より分離された 50 株を用いた。*H. cinaedi* CCUG18818 株のゲノム情報をもとに、MLST に用いる候補遺伝子として 21 個の housekeeping gene を選び、最終的に 7 遺伝子を選び MLST 法を確立した。薬剤感受性は 5% 馬血含有ミュラーヒントン寒天培地を用い、寒天平板希釈法により測定した。

ピラジナミドの作用メカニズムについては、標的候補分子としてキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ QAPRTase に着目し、この蛋白を大腸菌内で大量発現させた後、2 段階のカラムクロマトグラフィ操作により、SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行って機能解析を行った。酵素活性の測定は HPLC を用いて行った。

#### 倫理面への配慮

該当なし。

### C. 研究結果

*A. baumannii* の ST2 タイプに特異的な配列領域 (nt106-108) を見出した。本領域を ST2 識別のための領域とし、pyrosequencing 法による検出系を構築した。その結果、*A. baumannii* は 4 グループに分類され、ST2 はそのうちの単一グループに入った。今回は pyrosequencing 法を用いたが、その他の遺伝子変異を検出する方法でも本領域を解析することによって *A. baumannii* の ST2 を迅速・簡便な識別が可能であると考えられた。

病原性については *A. baumannii* は ST2 タイプにのみ大腸菌に対する殺菌活性が強い株が存在することを見出した。ST2 の株の T6SS 欠損株を用いた解析から、流行株の大腸菌に対する殺菌活性は T6SS の働きに依存していることが明らかとなった。

*H. cinaedi* については、7 遺伝子 (23S rRNA, *ppa*, *aspA*, *aroE*, *atpA*, *tkl*, *cdtB*) の塩基配列による MLST 法を確立した。臨床分離株 5 株を使用し、解析した結果 14 タイプの Sequence Type (ST)、8 種類の Clonal Complex (CC) に分類された。院内感染が疑われた病院 A では分離された 12 株のうち、11 株は同一の CC9 に分類された。さらに、CC9 に分類された菌株は全て同一の PFGE パターンを示した。薬剤感受性を測定した結果、日本で分離された *H. cinaedi* はいずれもクラリスロマイシンおよびシプロフロキサシンの MIC が 16 mg/L 以上であった。そこでこれらの抗菌薬の標的である 23S rRNA および DNA Gyrase を調査した結果、日本の分離株は全て 23S rRNA および GyrA の薬剤標的部位に変異を持っていた。

結核菌の QAPRTase に対する PZA と POA の阻害活性を測定した結果、pH7.2 の条件下で PZA が本酵素の活性を強く阻害することが示された。一方、POA にも弱い阻害活性が認められた。

### D. 考察

*A. baumannii* の流行タイプ ST2 に特異的な *bla<sub>OXA-51-like</sub>* 遺伝子配列を見出した。この配列を標的として、DNA プローブを用いた簡便な検出法の開発も可能と考えられた。

確立した *H. cinaedi* の MLST 法を用いれば、医療機関における院内感染発生時の菌株が同一クローンか別クローンかが判別出来るようになり、感染対策に活用出来ると考えられる。治療には、日本においてはマクロライドとフルオロキノロンは無効であると考えられる。

結核菌由来 QAPRTase の活性は PZA によって強く阻害された。PZA と QA の構造が類似していることなどから、PZA は QA 結合サイトに結合することによって本酵素の活性を阻害していると考えられる。今後は、本酵素と PZA の複合体の立体構造解析を行うことによって、詳細な PZA の結合様式を明らかにすることを予定している。本研究成果により、PZA を改良した新規抗結核薬の開発につながることを期待される。

### E. 結論

*A. baumannii* の流行タイプ ST2 に特異的な *bla<sub>OXA-51-like</sub>* 遺伝子配列を見出し、ハイロシークエンスによる検出系を構築した。本配列を検出することで、より迅速・簡便に ST2 の識別が可能であった。

近年の急速な *A. baumannii* の ST2 タイプの世界的拡散には T6SS の役割が重要であったことが示唆された。

*H. cinaedi* の MLST 法を確立した。日本においては *H. cinaedi* はクラリスロマイシンおよびシプロフロキサシン耐性株が非常に多いと考えられた。

結核菌由来 QAPRTase の発現・精製を行い、酵素学的諸性質を決定した。PZA が結核菌由来 QAPRTase の活性を中性条件下で強く阻害することを示した。

### F. 健康危険情報

*A. baumannii* は、ST2 タイプの場合多剤耐性のことが多く、また特に院内感染によりアウトブレイクを起こしやすいため、注意が必要である。

日本国内で分離される *H. cinaedi* は、ほとんどがマクロライドとフルオロキノロンに耐性である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Rimbara E, Mori S, Matsui M, Suzuki S, Wachino J, Kawamura Y, Shen Z, Fox JG, Shibayama K. Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from seven

hospitals in Japan. J Clin Microbiol. 2012  
Aug;50(8):2553-60.

## 2. 学会発表

- 1) M. Matsui, S. Suzuki, K. Shibayama, Y. Arakawa: Application of pyrosequencing assay for rapid detection of epidemic clonal lineage of *Acinetobacter baumannii*. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy, September 2012.
- 2) 松井真理、鈴木里和、鈴木仁人、柴山恵吾、荒川宜親：パイロシーケンスを用いた *Acinetobacter baumannii* 流行株の迅速検出方法の検討 第41回薬剤耐性菌研究会、2012年10月
- 3) 松井真理、鈴木里和、鈴木仁人、荒川宜親、柴山恵吾：パイロシーケンスによる一塩基多型検出法を用いたアシネトバクター流行株の新規スクリーニング方法の検討 第86回日本細菌学会総会、2013年3月
- 4) 森茂太郎、金玄、林原絵美子、荒川宜親、柴山恵吾。結核菌由来ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの機能解析。第86回日本細菌学会総会 2013年3月 千葉
- 5) 金玄、柴山恵吾、林原絵美子、森茂太郎。Expression, Purification and Characterization of Enzymatic activities of QAPRTase from *M. tuberculosis*. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月 千葉
- 6) 1. 林原絵美子、柴山恵吾。Helicobacter cinaediの分子疫学的解析と薬剤感受性。第18回日本ヘリコバクター学会学術集会 2013年3月 岡山
- 7) Emiko Rimbara, Shigetarou Mori, Mari Matsui, Satowa Suzuki, Jun-ichi Wachino, Yoshiaki Kawamura, Zeli Shen, James G. Fox, Keigo Shibayama. Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from 7 hospitals in Japan. XXVth International Workshop of the Helicobacter Study Group. Sep. 2013, Slovenia

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 薬剤耐性菌の分子疫学及び耐性機構に関する研究

(*Acinetobacter baumannii* 流行株スクリーニング方法の検討と分子疫学解析)

研究分担者	柴山 恵吾	(国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
研究協力者	松井 真理	(国立感染症研究所・細菌第二部・研究員)
研究協力者	鈴木 里和	(国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究員)
研究協力者	鈴木 仁人	(国立感染症研究所・細菌第二部・研究員)

### 研究目的

近年、*Acinetobacter baumannii* による感染症の増加とその多剤耐性化が急速に進んでいる。特に多剤耐性傾向が強く、院内感染事例の起原菌としての報告が多い世界流行株（International clone II）は最も警戒すべき株とされており、わが国でも本株は増加傾向にある。International clone II の識別方法は、Multilocus Sequence Typing (MLST) が主であるが、時間や手間がかかる。そこで本研究は、より迅速・簡便な International clone II 識別方法の開発を目的とした。

### 研究方法

2010年から2011年に国内22医療機関で分離された *Acinetobacter baumannii* で、異なる PFGE バンドパターンを示した 36 株及び、ATCC2 株（ATCC19606、ATCC17978）を対象とした。*A. baumannii* の同定は、*rpoB* 遺伝子シーケンス解析あるいは 16S-23S rRNA intergenic region の制限酵素切断パターンにて行った。

既報に従って Pasteur 研究所の手法と Bartual らの 2 手法の Multilocus Sequence Typing (MLST) を行い、International clone II 系統株か否かを識別した。*bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子は、その配列の違いによって 60 以上の亜型が報告されている。各株の *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子配列を比較し、International clone II 株の有する *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子特異的な領域を見出し、SNP 解析に用いた。SNP の検出・解析は pyrosequencing 法にて行った。

### 結果・考察

臨床分離 *A. baumannii* 36 株のうち、Pasteur 研究所の MLST 法で Sequence Type 2 (ST2) に分類された 21 株は全て、Bartual らの手法で ST92 及びその類縁株（Clonal complex 92）に属した。これら 21 株を International clone II と判定した。*bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子型は、OXA-66、-82、-83 のいずれかであった。一方で、他の臨床分離株 15 株と ATCC 株はいずれも International clone II 系統株と異なる *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子型を有していた。これらの結果に既報の *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子型を加えた 35 種の *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子配列を比較し、International clone II 特異的な配列領域

(nt106-108)を見出した。本領域を International clone II 識別のための領域とし、pyrosequencing 法による検出系を構築した。その結果、*A. baumannii* は4グループに分類され、International clone II はそのうちの単一グループを形成した。pyrosequencing 法に限らず、本領域を解析することによって *A. baumannii* の International clone II を迅速・簡便な識別が可能であると考えられた。

## 結論

*A. baumannii* の International clone II 特異的な *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子配列を見出し、パイロシーケンスによる検出系を構築した。本配列を検出することで、より迅速・簡便に International clone II 識別が可能であった。

## 研究発表

学会発表

1. M. Matsui, S. Suzuki, K. Shibayama, Y. Arakawa: Application of pyrosequencing assay for rapid detection of epidemic clonal lineage of *Acinetobacter baumannii*.  
52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy, September 2012
2. 松井真理、鈴木里和、鈴木仁人、柴山恵吾、荒川宜親：パイロシーケンスを用いた *Acinetobacter baumannii* 流行株の迅速検出方法の検討  
第41回薬剤耐性菌研究会、2012年10月
3. 松井真理、鈴木里和、鈴木仁人、荒川宜親、柴山恵吾：パイロシーケンスによる一塩基多型検出法を用いたアシネトバクター流行株の新規スクリーニング方法の検討  
第86回日本細菌学会総会、2013年3月

（抗結核薬ピラジナミドと NAD 代謝経路）  
薬剤耐性菌の分子疫学及び耐性機構に関する研究

研究分担者	柴山 恵吾	（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
研究協力者	森 茂太郎	（国立感染症研究所・細菌第二部・室長）
研究協力者	金 玄	（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）

### 研究目的

抗結核薬の1つであるピラジナミド (PZA) はニコチンアミド (NAM) の構造類縁体であり、結核菌の菌体内に取り込まれた後に活性型のピラジン酸[POA ; ニコチン酸 (NA) やキノリン酸 (QA) の構造類縁体]に変換され、酸性条件下で抗菌活性を示すことが明らかにされている。しかしながら、標的部位を含めて詳細な作用機序については不明の点が多く残されている。一方、NAM や NA、QA は NAD 生合成経路に深く関わっていることから、PZA や POA は NAD 生合成経路を標的としている可能性が考えられた。そこで本研究では、NAD 生合成経路に存在しているキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ (QAPRTase) の酵素活性に対して PZA や POA が与える影響について調べた。

### 研究方法

結核菌由来 QAPRTase を大腸菌内で大量発現させた後、2 段階のカラムクロマトグラフィー操作により、SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。酵素活性の測定は HPLC を用いて行った。

### 研究結果

HPLC の結果から、精製した結核菌由来 QAPRTase は、QA とホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) を基質として利用してニコチン酸モノヌクレオチドを生成する、QAPRTase 活性を示すことが確認された。ゲルろ過カラムの結果から、本酵素は溶液中で 2 量体を形成して活性を保持していることが示された。また、速度論的解析結果から、本酵素の QA に対する  $K_m$  値と  $V_{max}$  値はそれぞれ  $0.585 \pm 0.161$  mM と  $1.879 \pm 0.234$  U/mg であり、PRPP に対する  $K_m$  値と  $V_{max}$  値はそれぞれ  $1.076 \pm 0.159$  mM と  $2.413 \pm 0.156$  U/mg であった。また、至適 pH と至適温度はそれぞれ、pH9.2 と 60°C であり、活性の発現にはマグネシウム等の 2 価の金属イオンが必須であった。本酵素に対する PZA と POA の阻害活性を測定した結果、pH7.2 の条件下で PZA が本酵素の活性を強く