

201318032A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 柴山恵吾

平成 26 年(2014 年) 3 月

平成25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	室長
	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	一般財団法人 大阪府結核予防会大阪病院検査部	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	室長
	加藤はる	国立感染症研究所細菌第二部	室長
	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
	村山詠美	国立感染症研究所細菌第二部	非常勤職員
	大木留美	国立感染症研究所細菌第一部	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	国際看護大学校感染管理看護学	講師
	太田美智男	椙山女学園大学看護学部	教授
	八木哲也	名古屋大学大学院医学系研究科 臨床感染制御学	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
	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
	谷原真一	福岡大学医学部衛生・公衆衛生学	准教授

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究協力者 (続き)	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
	水上智之	独立行政法人国立病院機構 熊本医療センター小児科	医長
	針原 康	NTT 東日本関東病院	手術部長
	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
	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
石黒信久	北海道大学病院 感染制御部		

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究協力者 (続き)	岩崎澄央	北海道大学病院 検査・輸血部	
	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
	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
	佐藤智明	山形大学医学部附属病院検査部	技師長
	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		

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究協力者 (続き)	大花 昇	福島県立医科大学附属病院検査部	検査技師長
	吉永一彦	福岡大学医学部社会医学系総合研究室	
	高橋尚人	東京大学医学部附属病院小児科	准教授
	多治見公高	秋田大学大学院医学系研究科 救急・集中治療学講座	教授
	森兼啓太	山形大学医学部附属病院検査部感染制御部	部長
	後藤佑介	社会医療法人石心会川崎幸病院	看護師
	北仲博光	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	
	坂野弘嗣	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	
	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
	興石芳夫	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
	山下 計太	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
	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
	柳沢英二	(株)ミロクメディカルラボラトリー	
	青木弘太郎	東邦大学医学部微生物・感染症学講座	
	佐藤夏巳	名古屋大学大学院医学系研究科医療技術学	

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究協力者 (続き)	後藤謙介	名古屋大学大学院医学系研究科医療技術学	
	服部達也	名古屋大学大学院医学系研究科医療技術学	

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
2. 新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明12
荒川 宜親 名古屋大学大学院医学系研究科
- 1) NDM-1, OXA-181 等を産生する新型耐性菌に関する研究
- 2) ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌に関する研究
- 3) 黄色ブドウ球菌の薬剤耐性に関する研究
- 4) 臨床分離大腸菌におけるプラスミド伝達性キノロン耐性遺伝子の
耐性機構に関する研究
- 5) 健常人より分離された CTX-M 産生大腸菌のホスホマイシン耐性に関する研究
- 6) 食品における基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌の
汚染状況に関する研究
- 7) メタロ β -ラクタマーゼ産生菌の検出法に関する研究
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 42
(日本国内小児患者由来肺炎球菌の β -ラクタム剤耐性および
ニューキノロン系抗菌薬に対する低感受性化の解析)
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 …………… 45
(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
6. 多剤耐性緑膿菌に関する研究 ……………62
(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 …………… 69
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…………… 76
佐多 徹太郎 富山県衛生研究所
(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)
1) アシネトバクター属菌の鑑別法に関する研究
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 …………… 94
(バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)分離率の年次推移の解釈について)
鈴木 里和 国立感染症研究所
10. 多剤耐性菌のベータラクタマーゼの解析
(複数の医療施設から分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生
*Enterobacter cloacae*に関する分子疫学的検討) ……………99
舘田 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	102
富田 治芳 群馬大学大学院医学系研究科	
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	104
(サーベイランスに用いる日常検査データの問題点と対策の検討)	
長沢 光章 東北大学医学部附属病院	
13. 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	119
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	134
(抗酸菌の omnilog による測定法の確立に関する研究)	
松本 智成 大阪府結核予防会大阪病院	
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	136
(厚生労働省院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた	
感染症発生数の推定)	
山根 一和 川崎医科大学	
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	141
(グラム陽性菌の新型耐性機構に関する研究)	
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	144
IV. 研究成果の刊行物・別刷	152

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12月の時点までにNDM型カルバペネマーゼ産生菌等の新型耐性菌の分離例が数十例確認された。ほとんどの症例が外国で入院歴のある輸入例だった。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、これら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。これらの他、国内分離株から複数の新型カルバペネム耐性遺伝子を見いだした。今後も、新たな耐性菌の分離について監視を継続する必要がある。これまで見出した新型耐性菌のいくつかについては、新たな検出法も確立した。また結核菌については、キャピラリー電気泳動による簡便な型別法を開発した。院内感染でしばしば問題となる *Acinetobacter* 属菌については、臨床分離株 998 株の薬剤感受性パターンの解析の結果、レボフロキサシンに耐性の場合には特にアウトブレイクを起こしやすい *A. baumannii* 流行タイプ ST2 の可能性が高いため注意が必要であることが分かった。肺炎球菌については、13 価肺炎球菌ワクチンの導入に伴い、ペニシリン耐性が多い血清型 19A 型が今後減少することが期待されることが分かった。MRSA については、懸念されるバンコマイシンの感受性の低下傾向は認められなかった。肺炎球菌ではテリスロマイシン耐性の増加が懸念されているが、耐性メカニズムが内因性 rRNA メチル化酵素の欠損であることを見出した。グラム陰性菌のホスホマイシン耐性については、耐性遺伝子 *fosA3* が *bla_{CTX-V}* 遺伝子と同時にプラスミド上に存在し、IS26 に挟まれる形で伝播していることが分かった。カルバペネマーゼのうち IMP-1 については、結晶構造から新規阻害剤クエン酸モノベンジルエステルの合成に成功した。今後、化合物を改良して新規抗菌薬の開発につながる事が期待される。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業（JANIS）のデータを活用した研究では、検査部門のデータから感染症発症患者数の推定や、年次推移を調べる事が可能であることを示した。サーベイランスの精度向上に関する研究については、MRSA と *S. maltophilia* で調査したところ、精度管理の改善が必要な医療機関が相当あり、注意が必要であることが分かった。また集計にあたっては、VRE 等分離率の低い耐性菌ではアウトブレイクが起きている医療機関のデータを個別に手作業で除外する必要があることが分かった。サーベイランスデータを医療機関の感染対策に活用するツールとして、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ソフトウェアを開発した。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NDM型、KPC型やOXA-48型などのカルバペネマーゼ産生菌が途上国を中心に世界中に拡散している。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。

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、新型耐性菌の発生を監視し、またそれらが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、耐性に関与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 検査部門データを利用した感染症発生数の推定や、サーベイランスの精度向上に関する研究、またサーベイランスデータを臨床現場の感染対策に活用するツール開発を行った。

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12月の時点までにNDM型カルバペネマーゼ産生菌が11例、KPC型カルバペネマーゼ産生菌が7例、OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌が2例把握された。ほとんどの症例が外国で入院歴のある輸入例だった。また、NDM-1、OXA-48を同時に産生し、かつテトラサイクリン、ホスホマイシン、ST合剤にも耐性を示す多剤耐性株も見出された。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、これら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。これらの他、国内分離株から新型カルバペネマーゼ遺伝子PAM-1、TMB-2、IMP-43、IMP-44を見いだした。ネパールの医療機関で分離された株からは新規NDMバリエーションNDM-8を見出した。今後も、新たな耐性菌の分離について監視を継続する必要がある。NDM型カルバペネマーゼ産生菌はメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生菌のスクリーニング法であるSMAディスク法により検出可能であることが分かった。また、MBLと同時に他のβ-lactamaseを産生する株についても、SMAディスク法で検出可能であることも示された。緑膿菌に関しては、これまでに開発したIMP-type MBL、AAC(6')-IaeおよびAAC(6')-Ib産生多剤耐性緑膿菌臨床分離株迅速診断キットを組み合わせれば、日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約8割を迅速に検出できることが分かった。GBSについては、ペニシリン低感受性株が近年分離されているが、まずGBS自体を簡便に検出するため、LAMP法を開発した。Acinetobacter属菌については、臨床上重要な*A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis*を鑑別するMultiplex PCR法を開発した。また企業との共同研究で、*A. baumannii*の中でも特にアウトブレイクを起こしやすい遺伝子型ST2を簡便に検出するQprobe-PCR法を開発した。薬剤耐性菌の分子疫学については国立病院機構の86病院に協力頂き、

Acinetobacter属菌998株を収集した。その中で78%が*A. baumannii*で、そのうち28%はアウトブレイクを起こしやすい流行タイプST2だった。なお、多剤耐性*A. baumannii*は全てアミノグリコシド耐性遺伝子*armA*を保有していることが分かった。結核菌については、一般的に用いられている遺伝子型別法VNTR法を改良し、キャピラリー電気泳動装置を使用してより簡便かつ正確に型別を行う方法を開発した。肺炎球菌では、収集したペニシリン耐性株16株中、9株が血清型19Aだった。この血清型は、昨年度導入された13価肺炎球菌ワクチンでカバーされているため、今後分離率が減少することが予想される。MRSAについては、臨床分離株のバンコマイシンの感受性の低下が懸念されているが、収集株を実験室で測定したところそのような傾向は認められなかった。MBLを産生する腸内細菌科細菌は、必ずしもカルバペネムに耐性を示さないが、臨床から分離されたMBL陽性*Enterobacter cloacae*の71株を調べたところ22.5%のみが耐性だった。薬剤感受性検査成績のみでMBLs産生菌株を検出することは困難であることが再確認された。*Helicobacter fennelliae*については全ゲノム配列を決定し、データベースに登録した。肺炎球菌ではテリスロマイシン耐性の増加が懸念されているが、耐性メカニズムが内因性rRNAメチル化酵素の欠損であることを見出した。近年、大腸菌においてキノロン耐性が増加しているが、プラスミド性のキノロン耐性遺伝子*qnrA*の存在がシプロフロキサシン暴露時の菌の生存に有利に働いていることが分かった。ホスホマイシン耐性遺伝子*fosA3*については、*bla_{CTX-V}*遺伝子と同時にプラスミド上に存在し、IS26に挟まれる形で伝播していることが分かった。菌の生存カルバペネマーゼのうちIMP-1については、結晶構造から新規阻害剤クエン酸モノベンジルエステルを合成した。今後、化合物を改良して新規抗菌薬の開発につながる事が期待される。厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)のデータを活用した研究では、リステリアを例にとって、検査部門のデータから感染症発症患者数の推定や、年次推移を調べる事が可能であることが示された。サーベイランスの精度向上に関する研究については、MRSAでは本来はβ-ラクタム系薬はMICに関わらず耐性と報告されるべきところが、2012年の報告ではCEZ 1.7%、CMZ 4.6%、IPM/CS 1.7%がSまたはIと報告されており、また*S. maltophilia*ではIPM/CSは自然耐性でありRと報告されるべきであるが、223施設はSが0%であったものの、28施設においては1~100%となっていた。精度管理の改善が必要な医療機関が相当あることが分かった。集計にあたっては、VRE等分離率の低い耐性菌ではアウトブレイクが起きている医療機関のデータを除くことで全体集計が適切に出来る事が示された。また、サーベイランスデータを医療機関の感染対策に活用するツールとして、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と2DCM-webのepi-curve機能の改良を行った。感染対

策に関する研究では、「NICUのMRSA保菌と感染症についての見解と提言2014」を作成中である。

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。一方で、国内でも全く新型の耐性遺伝子を持つ耐性菌の分離が確認された。研究班では、今後もこれまでに国内で確認されているものに加え、海外からの輸入例、そして国内での新型耐性菌の発生を幅広く継続的にモニタリングしていく予定である。そしてそれらの検出法の開発、分子疫学解析、また耐性の分子メカニズムの解析など、感染対策に必要な基礎応用研究を進める予定である。

サーベイランスデータを医療現場の感染対策に効果的に活用するためには、サーベイランスの精度を高めるとともに、解析データを出来るだけ分かりやすい形で現場に還元することが必要である。この研究班では、データ集計の精度向上に関する研究と、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、その班と引き続き蜜に連携して、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、研究を進めて行く予定である。

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断続的に流入していることが確認された。また国内でも全く新型の耐性菌が発生していることが確認された。これらの耐性菌の中で、多剤耐性緑膿菌、*Acinetobacter*属菌、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌については検出法や分子疫学解析法を考案した。IMP型カルバペネマーゼは蛋白の結晶化及び構造解析を行い、阻害剤の開発に成功した。サーベイランスの研究では、精度向上に関して、医療現場の検査上および感染研におけるデータ集計上の課題が明らかになった。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。また、輸入例だけでなく国内でも新型の耐性菌の分離が見られるので注意が必要である。

*Acinetobacter*属菌については、分離菌がフルオロキノロンに耐性を示す場合は、特にアウトブレイクを起こしやすい*A. baumannii*流行タイプST2の可能性が高いため、拡散防止対策等感染対策に特に注意を払う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表
(各々の分担報告書に記載のため省略)
2. 学会発表
(各々の分担報告書に記載のため省略)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
(各々の分担報告書に記載のため省略)
2. 実用新案登録
(各々の分担報告書に記載のため省略)
3. その他
(各々の分担報告書に記載のため省略)

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）

この研究では、海外で蔓延している NDM 型カルバペネマーゼ産生菌等新型耐性菌やその他臨床問題となる耐性菌について、発生状況の監視、分子疫学解析、耐性メカニズムの解析、検査法の開発、新薬開発を行っている。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輸入事例を中心に 11 例から分離されている。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌はメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌のスクリーニング法である SMA ディスク法により検出可能であることを明らかにした。その他、国内の分離株から新型カルバペネマーゼ遺伝子 *bla*_{PAM-1}、*bla*_{PMB-2} を見出した。院内感染でしばしば問題となる *Acinetobacter baumannii* については、アウトブレイクを起こしやすい特に注意を要する流行タイプ ST2 を迅速に鑑別する手法を開発した。*A. baumannii* の *bla*_{OXA-51-like} 遺伝子配列で ST2 に特異的な配列領域 (nt106-108) を標的として、蛍光プローブを利用した簡便な Qprobe-PCR 法を企業と共同で開発した。国内の医療機関から *Acinetobacter* 属菌 998 株を収集して同定及び型別を調べたところ、74% が *A. baumannii* で、28% が ST2 だった。ST2 が院内感染を起こしやすいメカニズムについて、ゲノムから解析を行い、VI 型分泌機構が関与していることが示唆された。国内の医療機関で *H. fennelliae* による院内感染事例があったことを見出し、分離株の全ゲノム配列を決定した。結核菌については、新薬の標的となるキノリン酸ホスホリトランスフェラーゼとニコチン酸ホスホリトランスフェラーゼの両方の酵素活性を阻害する化合物を、*in silico* スクリーニングによって約 650 万種類の化合物の中から検索し、候補化合物を 39 種類見出した。

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、海外で蔓延している NDM 型カルバペネマーゼ産生菌等新型耐性菌やその他臨床問題となる耐性菌について、発生状況の監視、分子疫学解析、耐性メカニズムの解析、検査法の開発、新薬開発を行っている。外国で蔓延している NDM 型、KPC 型、OXA-48 型や、その他の新型カルバペネマーゼを産生する病原細菌について、国内での発生を監視した。また、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌については、従来メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌のスクリーニング法として用いられてきた SMA ディスク法が応用できるかを検証した。*Acinetobacter baumannii* は院内感染でしばしば問題となる薬剤耐性菌で、特に拡散しやすい遺伝子型 ST2 が存在する。国内でも多剤耐性を獲得した ST2 の株によるアウトブレイクがしばしば起こっているため、注意を要する。ここでは、ST2 の簡便な検出法を開発することとした。また、国内の医療機関でどのような遺伝子型の株が

分離されているのかを調査することとした。また、この ST2 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をゲノムから解明することとした。

Helicobacter fennelliae 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. fennelliae* 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。*H. fennelliae* は研究があまりすすんでいないため、基本情報が少ない。この研究では臨床分離株の全ゲノム配列を決定することとした。

結核菌について、新規薬剤の開発を最終目的として、NAD 代謝酵素に着目してピラジナミドの作用メカニズムの解析を行った。

B. 研究方法

国内の医療機関からカルバペネムに耐性を示す菌を収集し、PCR により遺伝子のスクリーニングを行った。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌については、ベトナムで分離された *A. baumannii* 4 株、大腸菌 5 株、*Klebsiella pneumoniae* 4 株、*Enterobacter cloacae* 1 株、*Citrobacter freundii* 1 株、及び日本国内で分離された *K. pneumoniae* 1 株を用いて、SMA ディスク法が応用できるかを検証した。*A. baumannii* については、これまでの研究で見出した

SMA ディスク法が応用できるかを検証した。*A. baumannii* については、これまでの研究で見出した *bla*_{OXA-51-like} 遺伝子配列で流行タイプに特異的な配列領域 (nt106-108) を標的として、東洋紡株式会社との共同研究で蛍光プローブをデザインし Qprobe-PCR 法で検出する方法を確立した。国立病院機構 86 病院の協力を得て、*Acinetobacter* 属菌を 998 株収集した。菌株の菌種同定、薬剤感受性試験、及び *bla*_{OXA-51-like} 配列を利用した遺伝子型別を実施した。代表的な株についてはゲノムを決定し、ST2 に特異的な遺伝子を検索した。結核菌については、キノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼのリコンビナント蛋白を作成し、ピラジナミド、及びその誘導体の本酵素に対する阻害活性を測定した。また、*in silico* スクリーニングによって、本酵素、並びにニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの両方の酵素活性を阻害する化合物を検索した。*H. fennelliae* については、全ゲノム配列を決定した。

倫理面への配慮

Acinetobacter 属菌の収集に際しては、感染研の倫理委員会に申請し、承認を得た上で進めた。

C. 研究結果

国内医療機関での NDM 型、KPC 型、OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌の分離状況を Table 1 に示す。これらのカルバペネマーゼ産生菌は、いずれも輸入例を中心に 10 例ほどである。

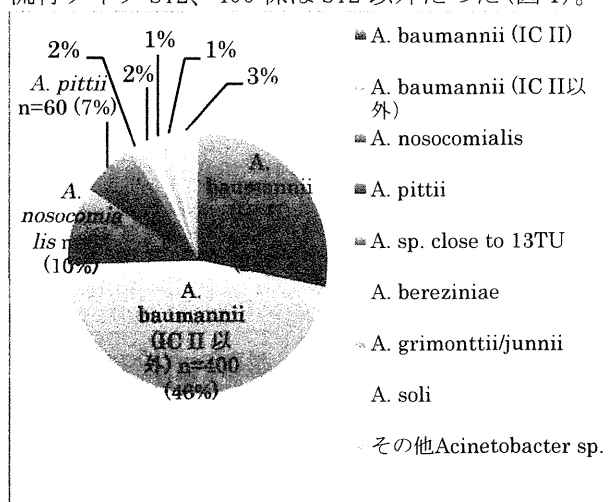
NDM 型カルバペネマーゼ産生腸内細菌及び *A. baumannii* を用いて、SMA ディスク法の評価を行った。通常、SMA ディスク法で推奨されているセフトジジム (CAZ) ディスクの他、イミペネム (IPM) ディスク、メロペネム (MPM) ディスクと SMA ディスクによる組み合わせの結果を Table 2 に示す。CAZ では、16 株中 7 株でのみ SMA の阻害効果が観察され、検出可能であった。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、多くの場合 SMA ディスクに阻害を受けない他のタイプの β -ラクタマーゼも同時に産生することが報告されており、このため検出率が低かったと考えられる。IPM では 14 株、MPM では 15 株で阻害効果が観察され、検出可能となった。MPM 及び IPM で陰性と判定された株では CAZ で陽性と判定された。この株は OXA-48 型カルバペネマーゼ遺伝子も同時に持っていた。OXA-48 型カルバペネマーゼは、SMA により阻害を受けないため、この影響で IPM、MPM いずれでも特徴的な阻止円が形成されなかったと考えられる。そして OXA-48 型カルバペネマーゼの CAZ 分解能は低いため、NDM 型カルバペネマーゼの SMA による阻害が CAZ でのみ観察されたと考えられる。

なお、収集したカルバペネム耐性 *Pseudomonas alcaligenes* において、新規のカルバペネマーゼ遺伝子 *bla*_{PAM-1} (accession number AB858498) を、*Acinetobacter pittii* と *Acinetobacter genomsp.* 14BJ からそれぞれ *bla*_{TMB-2} (accession number

AB758277, AB758278) を見出した。

A. baumannii の ST2 タイプを迅速簡便に検出するために、Qprobe-PCR 法を確立した。アシネトバクター属菌の ST2 タイプ 21 株、ST2 以外の *A. baumannii* 16 株、*A. baumannii* 以外 40 株、合計 77 株を用いたところ、全て MLST、パイロシーケンスを用いた検出法、*rpoB* シークエンスの結果と一致した。Qprobe-PCR では、コロニー懸濁液から約 40 分で判定が得られ、従来の MLST に比べてより迅速・簡便に IC II を識別可能と考えられた。

医療機関から *Acinetobacter* 属菌として送られてきた 998 株のうち、再同定により実際に *Acinetobacter* 属菌だったのは 866 株だった。うち、*A. baumannii* は 645 株 (74%) だった。うち、245 株は流行タイプ ST2、400 株は ST2 以外だった (図 1)。



ST2 は薬剤耐性の割合が ST2 以外の株と比較して明らかに高い傾向があった。特にフルオロキノロン耐性が高かった (図 2A, B, C)。

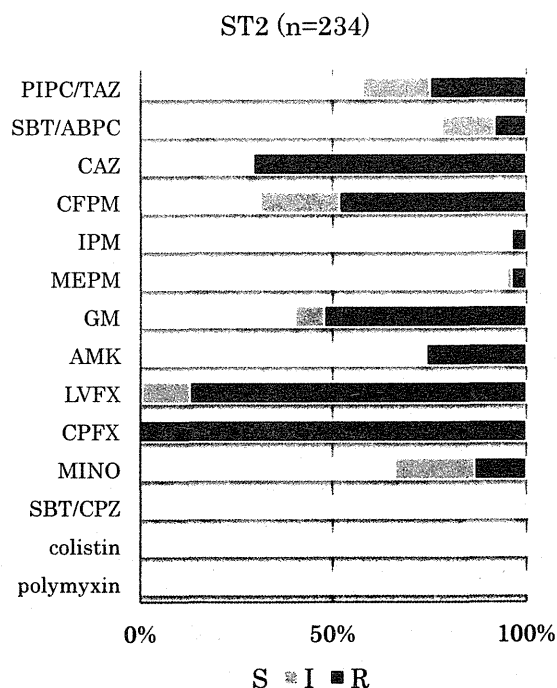


図 2A *A. baumannii* ST2 株の薬剤耐性パターン

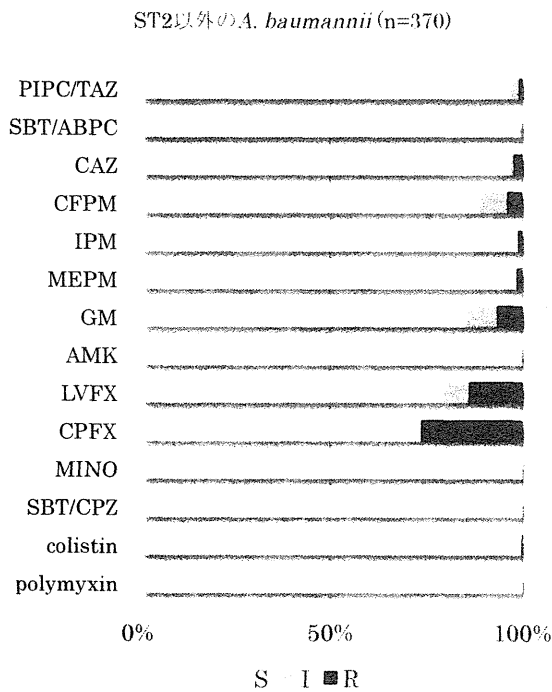


図 2B *A. baumannii* ST2 以外の株の薬剤耐性パターン

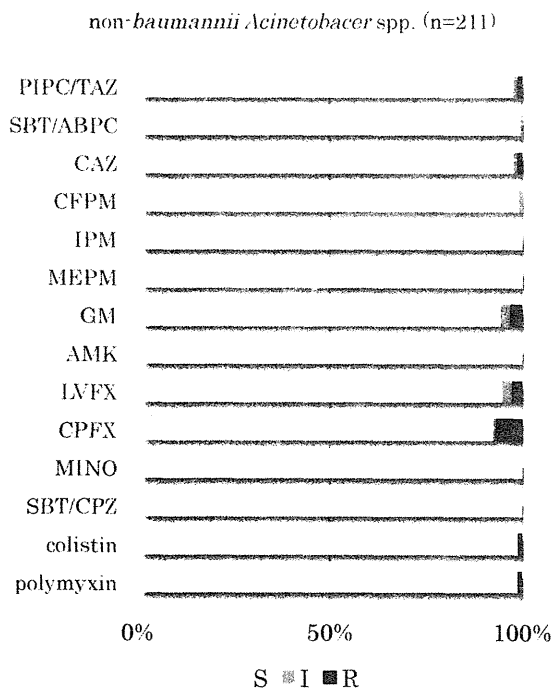


図 2C *A. baumannii* 以外の *Acinetobacter* 属の株の薬剤耐性パターン

病原性については *A. baumannii* は ST2 タイプ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 VI 型分泌機構 (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. fennelliae については、ゲノム情報がデータベース上にあまりないため、我々が分離した株の全

ゲノムを決定しデータベースに登録した (accession number BASD00000000)。全長 2.15 Mb、GC 含量は 37.9% だった。*Helicobacter cinaedi* や *Helicobacter hepaticus* と相同性が認められたが、これらに存在する病原因子 cytolethal distending toxin の遺伝子は認められなかった。

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に対して、ピラジナミドが阻害活性を示すことが分かった。また *in silico* スクリーニングによって、約 650 万種類の化合物を検索し、本酵素、並びにニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの両方の酵素活性を阻害すると予想される化合物を 39 種類見出した。今後、それらの化合物を入手し、実際の阻害活性を解析する予定である。

D. 考察

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は、現在のところ国内には輸入例を中心に 10 数例にとどまっていた。しかし、今後輸入例をきっかけに国内で拡散する恐れも有るため、注意深く監視することが必要である。これらのうち、NDM 型については SMA ディスク法で検出可能であり、スクリーニングに有用と考えられる。

国内から、新規のカルバペネマーゼ遺伝子 *bla_{TEM-1}* と *bla_{TEM-2}* を同定した。今後も、新たな耐性遺伝子が次から次へと出現すると予想される。

A. baumannii の流行タイプ ST2 を簡便に検出する Qprobe-PCR 法を東洋紡との共同研究で確立した。今後医療機関で普及すれば、特に注意を要する ST2 を従来の MLST 法に比べてより簡便・迅速に検出することが可能となる。国内の医療機関で分離される *Acinetobacter* 属菌では、74% が院内感染でよく問題となる *A. baumannii* だった。また 28% は特に拡散しやすく注意が必要とされている ST2 だった。ST2 は、とくにフルオロキノロン耐性の割合が高かった。つまり、医療機関でフルオロキノロン耐性の *A. baumannii* が分離されたら、ST2 の可能性を疑い、必要な感染対策等を実施する必要があると考えられる。また *A. baumannii* は染色体上に *bla_{OXA-51-like}* 遺伝子を持っているが、この遺伝子の上流に IS*Aba1* 配列が挿入されると、その配列に含まれるプロモーターにより遺伝子が発現し、カルバペネム耐性となる。IS*Aba1* は染色体上の他の場所に存在するので、この IS の転移によりカルバペネム耐性を獲得しやすい。その点からも、感染対策が重要である。

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とニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの両方の酵素活性を阻害すると予想される化合物を *in silico* スクリーニングで見出した。これらの化合物について、今後実際の抗菌活性、細胞毒性などを調べる予定である。

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は、現在のところ国内には輸

入例を中心に10数例にとどまっていた。

NDM型カルバペネマーゼ産生菌についてはSMAディスク法がスクリーニングに有用であることが分かった。

国内の医療機関で分離されたカルバペネム耐性菌から、新規のカルバペネマーゼ遺伝子 $bla_{\text{PMW-1}}$ と $bla_{\text{TMB-2}}$ を同定した。

*A. baumannii*の流行タイプST2を簡便に検出するQprobe-PCR法を東洋紡株式会社との共同研究で開発した。

国内の医療機関で分離される*Acinetobacter*属菌では、74%が*A. baumannii*で、28%は特に拡散しやすく注意が必要なST2だった。ST2は、特にフルオロキノロンに対する耐性の割合が高いことが分かった。

*H. fennelliae*の全ゲノム配列を決定した。

*A. baumannii*の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。

結核菌の新薬の標的となるキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼとニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの両方の酵素活性を阻害する化合物を、*in silico*スクリーニングによって約650万種類の化合物の中から検索し、候補化合物を39種類見出した。

F. 健康危険情報

医療機関において海外で入院歴のある患者を受け入れる場合は、NDM型、KPC型、OXA-48型カルバペネマーゼ産生菌等を保菌している可能性を考える必要がある。もしこれらが検出されたら、拡散防止のための対策を十分にとる必要がある。

医療機関において*A. baumannii*が分離され、フルオロキノロンに耐性の場合、アウトブレイクを起こしやすいST2タイプの可能性が高く、またカルバペネム耐性も獲得して多剤耐性化しやすいので、感染対策が特に重要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hagiya H, Murase T, Suzuki M, Shibayama K, Kokumai Y, Watanabe N, Maki M, and Otsuka F. *Chromobacterium violaceum* nosocomial pneumonia in two Japanese patients at an intensive care unit. J Infect Chemother. 2014 in press.
- 2) Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. A subclass B3 metallo- β -lactamase found in *Pseudomonas alcaligenes*. J Antimicrob Chemother. 2014 in press
- 3) Wachino J, Matsui M, Tran HH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K. Evaluation of a Double-Disk Synergy Test with a Common Metallo- β -Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. Jpn J Infect Dis. 2014;67(1):66-8.
- 4) Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. Genome Sequence of a Strain of the Human Pathogenic Bacterium *Pseudomonas alcaligenes* That Caused Bloodstream Infection. Genome Announc. 2013 Oct 31;1(5). pii: e00919-13.
- 5) Matsui M, Shibayama K, Tsuji Y, Kamimura H, Karube Y, Yoshida M, Masuda Y, Hiraki Y, Takaki K, Kawano F. Isolation of genetically indistinguishable carbapenem-resistant and -susceptible *Acinetobacter baumannii* Isolates from a single patient. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Nov;57(11):5781-2.
- 6) Rimbara E, Mori S, Kim H, Shibayama K. Role of γ -glutamyltranspeptidase in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Microbiol Immunol. 2013 Oct;57(10):665-73.
- 7) Rimbara E, Matsui M, Mori S, Suzuki S, Suzuki M, Kim H, Sekizuka T, Kuroda M, Shibayama K. Draft Genome Sequence of *Helicobacter fennelliae* Strain MRY12-0050, Isolated from a Bacteremia Patient. Genome Announc. 2013 Aug 8;1(4). pii: e00512-13.
- 8) Suzuki M, Matsui M, Suzuki S, Rimbara E, Asai S, Miyachi H, Takata T, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. Genome Sequences of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains from Nosocomial Outbreaks in Japan. Genome Announc. 2013 Jul 18;1(4). pii: e00476-13.
- 9) Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Arakawa Y, Shibayama K. Rapid discrimination of *Acinetobacter baumannii* international clone II lineage by pyrosequencing SNP analyses of $bla_{\text{OXA-51-like}}$ genes. J Microbiol Methods. 2013 Aug;94(2):121-4.
- 10) Rimbara E, Mori S, Kim H, Matsui M, Suzuki S, Takahashi S, Yamamoto S, Mukai M, Shibayama K. *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* transmission in a hospital from 2008 to 2012. J Clin Microbiol. 2013 Jul;51(7):2439-42.
- 11) Matsuoka M, Sasaki T, Seki N, Kobayashi M, Sawabe K, Sasaki Y, Shibayama K, Sasaki T, Arakawa Y. Hemin-binding proteins as potent markers for serological diagnosis of infections with *Bartonella quintana*. Clin Vaccine Immunol. 2013 Apr;20(4):620-6.
- 12) Suzuki S, Matsui M, Suzuki M, Sugita A, Kosuge Y, Kodama N, Ichise Y, Shibayama K. Detection of tripoli metallo- β -lactamase 2 (TMB-2), a variant of $bla_{\text{TMB-1}}$, in clinical

isolates of *Acinetobacter* spp. in Japan. J Antimicrob Chemother. 2013 Jun;68(6):1441-2.

2. 学会発表

- 1) 松井真理, 鈴木 仁人, 鈴木 里和, 曾家 義博, 柴山 恵吾. Qprobe-PCRによる *Acinetobacter baumannii* 世界流行株の検出方法の検討. 第25回日本臨床微生物学会総会 2014年2月1-2日. 名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
- 2) 松井真理, 和知野 純一, Hoang Huy Tran, 鈴木 里和, 鈴木 仁人, 柴山 恵吾. SMA ディスクを使った NDM 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株スクリーニング方法の検討. 第25回日本臨床微生物学会総会 2014年2月1-2日. 名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
- 3) 松井真理, 鈴木里和, 鈴木仁人, 荒川宜親, 柴山恵吾. 日本で分離されたアシネトバクター流行株と非流行株の分子疫学的特徴の比較. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月 東京
- 4) 鈴木 仁人, 松井 真理, 鈴木 里和, 柴山 恵吾 「アシネトバクター・バウマニと緑膿菌の細菌間競争」 第48回緑膿菌感染症研究会, 長崎県医師会館 (長崎県長崎市), 2014年1月24-25日
- 5) 鈴木 仁人, 松井 真理, 鈴木 里和, 柴山 恵吾 「薬剤耐性菌流行株の分子遺伝学的解析」 第36回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市), 2013年12月3-6日
- 6) 鈴木 仁人, 松井 真理, 鈴木 里和, 平木 洋一, 河野 文夫, 柴山 恵吾 「新規メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* の解析」 第42回薬剤耐性菌研究会, ホテルニューさがみや (静岡県熱海市), 2013年10月17-18日
- 7) Matsui, M., Suzuki, S., Suzuki, M., Arakawa, Y., and Shibayama K. Molecular characterization of epidemic and non-epidemic type *Acinetobacter* spp. isolated in Japan. 9th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter* (*Acinetobacter* 2013), Cologne, Germany, 2013年6月19-21日
- 8) Suzuki, S., Matsui, M., Suzuki, M., Aminaka, M., Yamagishi, T., Wachino, J., Arakawa, Y., and Shibayama, K. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in Japan, 2011-2012. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2013, ICC Berlin (Berlin, Germany), 2013年4月27-30日
- 9) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv for

the design of new anti-tuberculosis drugs. International Conference on Structural Genomics. 29 July-1 August, 2013, Sapporo, Japan.

- 10) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a novel diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.
- 11) Mori, S., H. Kim, E. Rimbara, and K. Shibayama. Structural insights into a novel diadenosine tetraphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector-Borne Diseases, 12-13 September, 2013, Tokyo, Japan.
- 12) 森茂太郎, 金玄, 林原絵美子, 柴山恵吾. Functions and structures of MAV_3489 from *Mycobacterium avium* and MSMEG_2932 from *M. smegmatis*. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月 東京
- 13) 金玄, 横山和正, 中島千絵, 森茂太郎, 柴山恵吾, 鈴木定彦. 結核菌 DNA ジャイレースにおけるキノロン耐性決定領域外に見出されたアミノ酸置換のキノロン剤耐性への影響. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2013年5月29日-30日. 埼玉県産業文化センター、埼玉県さいたま市大宮.
- 14) 金玄, 横山和正, 中島千絵, 鈴木定彦. 結核菌 DNA ジャイレース上の菌系統特異的アミノ酸多型のキノロン剤耐性への影響. 第86回日本ハンセン病学会総会・学術大会. 2013年5月29日-30日. 埼玉県産業文化センター、埼玉県さいたま市大宮.
- 15) Kim, H., S. Mori, E. Rimbara, and K. Shibayama. Enzymatic activities of Quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Sept. 10 - 13, 2013. Denver, Colorado.
- 16) 林原 絵美子, 森 茂太郎, 金 玄, 松井 真理, 鈴木里和, 高橋 俊司, 山本 聡, 向井 正也, 柴山 恵吾. 同一の病院で分離された *H. cinaedi* と *H. fennelliae* の分子疫学的解析と薬剤感受性. 第19回日本ヘリコバクター学会学術集会. 2013年6月28日-29日. 長崎大学医学部, 長崎県長崎市

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む。)