

1. 特許取得

松井 真理、鈴木 仁人、鈴木 里和、柴山 恵
吾、曾家 義博「アシネトバクター・パウ
マニの検出方法およびその試薬」出願番
号：特願 2014-014286

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1.

表. わが国における NDM 型, KPC 型および OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌分離患者 (2013 年 7 月現在)			
	菌種	渡航先	
NDM 型カルバペネマーゼ産生菌分離患者			
1	2010 年実態調査報告例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	無し
2	2010 年実態調査報告例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	無し
3	2011 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	インド
4	2013 年解析依頼例	<i>Escherichia coli</i>	バングラデシュ
上記以外の学会・論文による報告例			
5	2011 年報告例 ¹⁾	<i>Escherichia coli</i>	インド
6	2012 年報告例 ²⁾	<i>Acinetobacter baumannii</i>	インド
7*	2013 年報告例 ³⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	あり(アジア)
KPC 型カルバペネマーゼ産生菌分離患者			
1	2010 年実態調査報告例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	あり(渡航先不明)
2	2011 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	北米
3	2012 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	中国
4	2012 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	インド
5	2012 年解析依頼例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	インド
上記以外の学会・論文による報告例			
6	2009 年報告例 ⁴⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	米国
7	2012 年報告例 ⁵⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ブラジル
OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌分離患者			
1	2010 年実態調査報告例	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	インド
上記以外の学会・論文による報告例			
2	2012 年報告例 ⁶⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	あり(東南アジア)
3*	2013 年報告例 ³⁾	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	あり(アジア)
* 同一症例より分離された同一菌株(本号 19 ページ参照)			
1) Chihara S, <i>et al.</i> , Clin Infect Dis 52: 153-154, 2011			
2) Nakazawa Y, <i>et al.</i> , J Infect Chemother 19: 330-332, 2013			
3) 外山雅美, 他, IASR 34: 237-238, 2013			
4) 諸熊由子, 他, 日臨微生物誌 19(4):136, 2009			
5) 高橋里枝子, 他, 日臨微生物誌 22(4):158, 2012			
6) 柴山恵吾, 他, IASR 33: 336-337, 2012			



2013 年 8 月以降 12 月まで国立感染症研究所で解析依頼を受けた症例

NDM-1

<i>E. coli</i>	中国渡航歴あり
<i>E. coli</i>	インドネシア渡航歴あり
<i>K. pneumoniae</i>	インドネシア渡航歴あり
<i>E. coli</i>	インド渡航歴あり

OXA-48

<i>K. pneumoniae</i>	海外渡航歴なし
----------------------	---------

Table 2. Inhibitory activity of sodium mercaptoacetate (SMA) disks for New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-1-producing bacterial isolates

Bacterial isolates	Antibiotic disks		
	Ceftazidime (CAZ)	Imipenem (IPM)	Meropenem (MPM)
<i>E. coli</i> V-22	+	+	+
<i>E. coli</i> V-48	+	+	+
<i>E. coli</i> V-91	-	+	+
<i>E. coli</i> V-102	-	+	+
<i>E. coli</i> V-134	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> MRY10-722	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i> V-17	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-21	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-90	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i> V-182	-	+	+
<i>E. cloacae</i> V-87	+	-	-
<i>C. freundii</i> V-868	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-275	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-303	+	+	+
<i>A. baumannii</i> V-320	-	+	+
<i>A. baumannii</i> V-357	-	+	+

(+), positive; (-), negative; *E. coli*, *Escherichia coli*; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*; *E. cloacae*, *Enterobacter cloacae*; *C. freundii*, *Citrobacter freundii*; *A. baumannii*, *Acinetobacter baumannii*

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 (NDM-1, OXA-181 等を産生する新型耐性菌に関する研究)

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学／耐性菌制御学・教授）
研究協力者 長野 則之（名古屋大学大学院医学系研究科・客員研究員）
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）

研究要旨：NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼ産生株や OXA-181 カルバペネマーゼ（OXA-48 の亜型）産生株はいずれもインドと関連して最初に確認され、世界各地への急速な広がりがみられている。さらに最近ではインド、シンガポール、ノルウェーでこれらの酵素を同時に産生する株も新たに確認されている。本研究では本邦で初めて確認された NDM-1、OXA-181 等を同時産生する *Klebsiella pneumoniae* の解析を目的とする。自国の医療機関に入院歴を有し 2013 年 6 月治療目的で来日、東日本の医療機関に入院したアジア系の 70 歳代男性患者の喀痰より検出された広範囲抗菌薬耐性 *K. pneumoniae* (Kp3) 及びこれと薬剤感受性プロファイユルが異なるカルバペネム系薬耐性の便由来 *K. pneumoniae* (Kp4) と *Escherichia coli* (Ec2) 株を対象に耐性因子等の解析を実施した。Imipenem 及び meropenem を基質とした SMA による酵素阻害試験の結果、Kp3 株と Kp4 株は陰性であったが、Ec2 株は meropenem で陽性反応が認められメタロ-β-ラクタマーゼ産生性が示唆された。しかしながら ertapenem disk を用いた modified Hodge test では Ec2 株以外の 2 株が陽性を示しカルバペネマーゼ産生性が示唆された。Kp3 株は *bla*_{NDM-1}、*bla*_{OXA-181} に加え、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{CMY-4}、*bla*_{TEM-1}、*armA* 及び *qnrB* を保有していた。Kp4 株は *bla*_{OXA-181}、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{TEM-1}、また Ec2 株のは *bla*_{NDM-1}、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{CMY-42} を保有していた。MLST 解析の結果、Kp3、Kp4、Ec2 株はそれぞれ ST231、ST43、ST410 と同定された。国内では NDM-1 産生株はこれまでに 6 事例で確認されているが、Kp3 株のように OXA-181 との共産生株の検出は本事例が初めてである。本株は 3 系統の薬剤に加えテトラサイクリン系薬、fosfomycin、ST 合剤にも耐性を示す広範囲抗菌薬耐性株であった。このような株の国内への侵入の機会は今後益々増えてくることも懸念され、危機感をもって日常的な監視体制の強化とともに適正な感染制御の実施を遂行することが必要である。

A. 研究目的

KPC 型、OXA-48 型、NDM 型カルバペネマーゼは世界的に最も警戒されている新型カルバペネマーゼである。NDM-1 産生株は 2008 年に初めて見いだされたが、インドやパキスタン地域で医療行為を受けイギリスなど自国へ帰国後感染症を呈した旅行者から多数分離されインド亜大陸との疫学的関連性が報告されている。OXA-48 産生株は 2001 年にトルコで初めて確認されて以降、欧州各国で急速に拡がり問題となってきている。最近では米国、カナダからも報告されている。国内では 2012 年 11 月に我々が初めて東南アジア帰国事例より OXA-48 産生株を確認した。OXA-48 の亜型である

OXA-181 産生株は 2007 年にインドで最初確認され、その後インドからの輸入事例がオランダ、フランスなどいくつかの国で報告されている。本研究は本邦で初めて確認された NDM-1、OXA-181 等を共産生する株の解析を目的とする。

B. 研究方法

消化器系癌治療にて自国の医療機関に入院歴を有し、2013 年 6 月に術後重篤肺炎の治療の目的で来日、東日本の医療機関に入院した 70 歳代の南アジア系男性の喀痰から検出された広範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* Kp3 株、また、便から検出されたカルバペネム系薬耐性

K. pneumoniae Kp4 株と *Escherichia coli* Ec2 株を対象に耐性因子等の解析を実施した。MIC 測定は CLSI の微量液体希釈法により行った。カルバペネマーゼの検出には CLSI の推奨する *ertapenem disk* を用いた *modified Hodge test* を実施した。また、メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)、3-アミノフェニルボロン酸及びクラブラン酸による酵素阻害試験を行った。耐性決定因子 *bla*_{NDM-1} group、*bla*_{OXA-48} group、*bla*_{CMY} group、*bla*_{CTX-M-1} group、*bla*_{TEM} group、16S rRNA methylase の *armA*、プラスミド性キノロン耐性因子 *qnrB* の PCR 検出、さらにβ-ラクタマーゼ構造遺伝子の塩基配列解析を行った。また、プラスミドの Inc typing 及び検出株の MLST 解析を実施した。

倫理面への配慮

本研究の内容を論文等で公表するにあたり、事前に患者及びその家族からインフォームドコンセントを取得している。

C. 研究結果

Kp3 株に対する *imipenem* (IPM) と *meropenem* (MEM) の MIC 値はそれぞれ >8 µg/ml と >16 µg/ml と耐性で、さらに *colistin* (CL) と *tigecycline* (TIG) を除いて試験した全ての系統の全ての薬剤に耐性を示していた。この結果から Kp3 株は広範囲抗菌薬耐性(*extensively drug-resistant*; XDR)株と考えられる。Kp4 株では IPM の MIC は 2 µg/ml、MEM の MIC は 16 µg/ml と Kp3 株と比較して低値であったがその他のβ-ラクタム系薬は全て耐性であった。一方、Ec2 株の場合カルバペネム系薬を含めβ-ラクタム系薬は耐性で、且つフルオロキノロン及びアミノグリコシド系薬耐性と3系統全てに耐性を示す多剤耐性株であった。なお、Kp4 と Ec2 株ともに CL と TIG に感性を示していた (Table 1)。

Kp3 株は *modified Hodge test* で明瞭な陽性結果が得られカルバペネマーゼ産生性が示唆された。しかしながら、SMA による酵素阻害試験は陰性で、また、クラブラン酸やボロン酸による酵素阻害試験も陰性であった。Kp4 株の場合 *modified Hodge test* 陽性でカルバペネマーゼ産生性が示唆されたが SMA による酵素阻害試験は陰性であった。クラブラン酸による酵素阻害試験では *ceftazidime* (CAZ) でわずかな阻止円の拡張が認められた。以上の結果から ESBL 産生性に加え CAZ の分解性が低いカルバペネマーゼの存在が示唆された。Ec2 株では、*modified Hodge test* が陰性であったが、SMA による酵素阻害試験で MEM を基質とした場合明瞭な陽性、IPM を基質とした場合やや不鮮明ながら陽性結果が得られたことからメタロ-β-ラクタマーゼ

の産生性が示唆された。さらにクラブラン酸による酵素阻害試験では *aztreonam* のみでわずかな阻止円の拡張が認められ、ESBL 産生性が示唆された。

Kp3 株はカルバペネマーゼ遺伝子として *bla*_{NDM-1} に加え *bla*_{OXA-181} を保有していた。その他 *bla*_{CMY-4}、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{TEM-1}、*armA*、*qnrB* の保有が確認された。*bla*_{NDM-1}、*bla*_{CMY-4}、*armA* は Inc A/C プラスミドとともに *E. coli* χ1037 *rif*^R に接合伝達された。Kp4 株は *bla*_{OXA-181}、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{TEM-1} を保有していた。Ec2 株は *bla*_{NDM-1} に加えて *bla*_{CMY-42}、*bla*_{CTX-M-15} を保有していた。これら3株の MLST 解析の結果、Kp3 株が ST231、Kp4 株が ST43、Ec2 株が ST410 (CC23) と同定された。

D. 考察

NDM-1 と OXA-181 共産生 *K. pneumoniae* 株は国内では初めて検出されたが、これまでにノルウェー、オマーン、シンガポールから報告されており、ノルウェーの事例ではルーマニアとの疫学的関連性が示唆されている。またフランスの *Citrobacter freundii* 株の事例ではインド亜大陸との疫学的関連性が報告されている。さらには Kp3 株で同定された NDM-1 産生 *K. pneumoniae* ST231 は、インドをはじめイギリス、スペイン、カナダ、モーリシャスから報告されており、スペインの事例ではインドとの疫学的関連性が示唆されている。また、Ec2 株で同定された NDM-1 産生 *E. coli* ST410 は、インドとの関連性が示唆されるノルウェーやカナダをはじめ、イギリスやスイス、オーストラリアから報告されている。NDM-1 産生株は複数の耐性メカニズムを併せ持つことにより多剤耐性のプロファイルを示すことが多い。事実 Kp3 株も OXA-181、CMY-4、CTX-M-15、TEM-1、ArmA、QnrB を共産生し広範囲抗菌薬耐性を示していた。このような広範囲抗菌薬耐性株の存在は、抗菌薬の選択肢が狭まる中での将来的な流行が懸念される。

Kp3 株では *modified Hodge test* が陽性であったことを除いてすべての酵素阻害試験で陰性を示していた。このように全ての酵素阻害試験で陰性であった理由としては産生された複数の耐性酵素が相互に干渉することによるものと思われ、網羅的な耐性遺伝子の検索を余儀なくされた。臨床微生物検査室ではこのような菌株に遭遇した際には直ちに院内感染対策を強化すると共に専門機関などに解析を依頼する必要がある。NDM-1 産生 Ec2 株では SMA disk による酵素阻害試験でメタロ-β-ラクタマーゼ産生性を推定し得たが、*modified Hodge test* は陰性

であった。NDM-1 産生株では modified Hodge test の感度が 50%と低いことに注意が必要である。しかしながら我々の経験では国内で多く検出される IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の場合 modified Hodge test で明瞭な陽性反応が認められることを確認している。

カルバペネム耐性腸内細菌(CRE)の世界的な蔓延に、CRE の流行地域で入院歴を有する患者のメディカルツーリズムなどが重要な役割を果たしている。本事例も南アジアの医療機関からの持ち込みと考えられ、海外の医療機関で入院治療歴を有する患者を受け入れる際には CRE をはじめ薬剤耐性菌のスクリーニングが必要であると考えられる。

E. 結論

メディカルツーリズムで来日した南アジア系男性患者から国内で初めて NDM-1、OXA-181 等を共産生する *K. pneumoniae* 株が確認された。本株は広範囲抗菌薬耐性であったことから海外の医療機関で入院治療歴を有する患者を受け入れる際には CRE をはじめ薬剤耐性菌のスクリーニングが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

国内では NDM-1、OXA-181 共産生株の検出は本事例が初めてである。本株は広範囲抗菌薬耐性であったが、このような株の国内への侵入の機会は今後益々増えてくることも懸念され、危機感をもって日常的な監視体制の強化とともに適正な感染制御の実施を遂行することが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

・海外より来日した患者から検出された NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼと OXA-181 カルバペネマーゼ等を同時に産生する広範囲抗菌薬耐性肺炎桿菌
(厚生労働省 病原微生物検出情報, IASR Vol. 34 p. 237-238: 2013 年 8 月号)

2. 学会発表

・第 42 回薬剤耐性菌研究会
NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼ, OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の出現
・第 25 回日本臨床微生物学会総会
NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼ, OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の出現

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきもの無し

TABLE 1. Antimicrobial susceptibilities and molecular characteristics of *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates harbouring carbapenemase genes, *bla*_{OXA-181}, and/or *bla*_{NDM-1} in Japan

Isolate	Species	ST	Carbapenemase genes	Other resistance genes	Plasmid Inc. types	Antimicrobial susceptibility, MIC (µg/ml)																	
						IPM	MEM	PIP/TAZ	CTX	CTX/CLA	CAZ	CAZ/CLA	ATM	FEP	CMZ	GM	AMK	LVX	MNO	FOS	SXT	TIG ^b	CL ^b
Kp3	<i>K. pneumoniae</i>	231	NDM-1 OXA-181	CTX-M-15, CMY-4 TEM-1, ArmA QnrB	A/C, FIA	>8	>16	>64	>128	>32/4	>128	>32/4	>64	>32	>32	>8	>32	>4	>8	>16	>2	1	0.19
Kp3 TC ^a	<i>E. coli</i>	-	NDM-1	CMY-4 ArmA	A/C	4	4	>64	128	>32/4	>128	>32/4	2	>32	>32	>8	>32	≤0.5	≤1	≤4	≤2	NT ^c	NT
Kp4	<i>K. pneumoniae</i>	43	OXA-181	CTX-M-15 TEM-1	untype-able	2	16	>64	>128	16/4	>128	8/4	>64	>32	>32	≤1	≤4	>4	4	≤4	≤2	1	0.38
Ec2	<i>E. coli</i>	410	NDM-1	CMY-42 CTX-M-15	II-Ig, FIA FIB, Y, F	>8	>16	>64	>128	>32/4	>128	>2/4	>64	>32	>32	>8	8	>4	≤1	≤4	≤2	0.25	0.25
χ1037	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	≤1	≤0.5	≤8	≤0.5	≤0.12/4	≤0.5	≤0.12/4	≤0.5	≤1	≤0.5	≤1	≤4	≤0.5	≤2	≤4	≤2	NT	NT

IPM, imipenem; MEM, meropenem; PIP/TAZ, piperacillin/tazobactam; CTX, cefotaxime; CLA, clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; FEP, cefepime; CMZ, cefmetazole; GM, gentamicin; AMK, amikacin; LVX, levofloxacin; MNO, minocycline; FOS, fosfomicin; SXT, sulfamethoxazol-trimethoprim; TIG, tigecycline; CL, colistin.

Kp3 TC^a, transconjugants of *E. coli* χ1037 that acquired a plasmid from Kp3; ^bMIC results of the Etest; ^cNT, not tested.

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 （ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌に関する研究）

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学／耐性菌制御学・教授）

研究協力者 木村 幸司（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学／耐性菌制御学・講師）

研究要旨: B 群連鎖球菌(*Streptococcus agalactiae*, Group B streptococcus, GBS)は、これまでペニシリンを含むβ-ラクタム系薬に一樣に感受性を示すと考えられてきたが、我々は、ペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 2X に変異を獲得し、ペニシリン系薬、セファロスポリン系薬に低感受性を獲得したペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) の出現を報告した(Kimura K., et al. AAC 2008)。PRGBS の検出を促進するためには、GBS 自体の検出を簡便にする必要があると考え、GBS を簡便に迅速に検出する方法として、GBS 検出用 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を開発した(Kimura K., et al. JJID 2013)。また、臨床分離 PRGBS のうち、セフチゾキシムに極めて高い MIC 値を示す株を解析し、GBS は PBP2X のみならず PBP1A にも変異を獲得するとセフチゾキシム高度耐性を獲得することを明らかにした(Kimura K., et al. JAC 2013)。

A. 研究目的

B 群連鎖球菌(*Streptococcus agalactiae*, Group B streptococcus, GBS)は、新生児の敗血症、髄膜炎の筆頭原因菌であるとともに、高齢者や糖尿病患者等に侵襲的な感染症を引き起こす。GBS は、これまでペニシリンを含むβ-ラクタム系薬に一樣に感受性を示すと考えられてきたが、我々は、ペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 2X に変異を獲得し、ペニシリン系薬、セファロスポリン系薬に低感受性を獲得したペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (Group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) の出現を報告した(Kimura K., et al. AAC 2008)。これまでに、PRGBS の検出には、オキサシリン、セフチゾキシム、セフチブテンの各ディスクを用いたディスク拡散法が有効であること(Kimura K., et al. JCM 2009)、数週間の間隔をあけて遺伝的に同一と考えられる PRGBS 二株が分離された症例 (Nagano N., Kimura K., et al. JAC 2009)、PRGBS の PBP

遺伝子の変異箇所解析から、PRGBS が多源的に出現していること (Nagano N., Nagano Y., Kimura K., et al. AAC 2008; ASM Microbe 誌の Journal Highlight に取り上げられる)、Multilocus sequence typing (MLST)により、国内の PRGBS は、ST458 と ST1 を含む CC から多く出現しているが、その他遺伝的に関連性の薄い菌株群からも多源的に出現していること (Kimura K., et al. JAC 2011)、2007-2008 年に分離された妊婦臍スワブ由来 141 株の GBS の中からは PRGBS は検出できず、妊婦臍スワブ由来 GBS では PRGBS は稀であること (Kimura K., et al. JJID 2013)、PRGBS は 1990 年代に出現したと推定されること (Kimura K., et al. JJID 2013)、PRGBS は多剤耐性化傾向があること (Kimura K., et al. JAC 2013)、広く国内で使用されている、A 社の自動感受性測定機器では、PRGBS の半数程度(13/28, 46.4%)がペニシリンに対する感受性を正しく判定できないこと (Kimura K., et al. JAC 2013)などを明らかにしてきた。

今回は、PRGBS の検出を促進するため、GBS の迅速、簡便な検出法の開発と、臨床分離 PRGBS のうち、セフチゾキシムに極めて高い耐性を示す株 B1 のセフチゾキシム高度耐性機構を解析した。

B. 研究方法

医療施設の細菌検査室での GBS の検出を促進するためには、高価な機器類を必要としない検出法が必要であると考え、等温で核酸を増幅し、濁度ないし蛍光で核酸の増幅を検出する Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を用いることとした。標的遺伝子としては、GBS に特異的で臨床分離 GBS の大部分が有していると既に報告のあった CAMP factor をコードする *cfb* 遺伝子を選んだ。GBS ATCC12403 (NEM316) 株の full-length *cfb* 遺伝子 (*gbs2000*) の配列を用い、Primer Explorer ver.4 を使用して、候補プライマー群配列を選定した。候補プライマー群から、Loopamp DNA Amplification Kit 及び LA-320C Loopamp Real-time Turbidity Detector を用いて、実際に LAMP 反応を行い、図 1 のプライマーセットを決定した。感度の測定には、GBS ATCC BAA-611 (2603V/R) の精製染色体 DNA を鋳型として用いた。また、特異度の検討には、GBS ATCC 株 2 株、GBS 臨床分離株 4 株、Streptococcus 属及び Enterococcus 属の標準株 16 株の精製染色体 DNA を鋳型として用いた(Kimura K., et al. JJID 2013)。

セフチゾキシム高度耐性株 B1 は、PBP2X に PRGBS に特徴的な Q557E 変異を獲得しているのみならず、PBP1A の活性中心を形成していると考えられる K₅₄₀TG motif のごく近傍に G539S 変異を獲得していることが、既に明らかであった。我々は、この PBP1A の G539S 変異のセフチゾキシム高度耐性における役割を明らかにするために、セフチゾキシム競合実験を行うと共に、相同組み換えにより、B1 由来 PBP2X と B1 由来 PBP1A をβ-ラクタム系薬感性の標準株 GBS ATCC BAA-611 株に導入し、β-ラクタム系薬の MIC を測定した(Kimura K., et al. JAC

2013)。

倫理面への配慮 今回の研究は、主に菌株を対象とした研究であり、倫理審査を必要とする研究計画は含まれていない。

C. 研究結果

図 1 に示すプライマーセットを用い、GBS ATCC BAA-611 (2603V/R) の染色体 DNA を鋳型に LAMP 反応を行ったところ、10 fg (~4 copy) まで検出できることが明らかとなった。また、17 菌種の Streptococci, Enterococci の染色体 DNA を鋳型に特異度を検討した結果、GBS 特異的に LAMP 反応が起こり、GBS を特異的に検出できることが明らかになった(Kimura K., et al. JJID 2013)。

セフチゾキシム競合実験により、セフチゾキシムの標的分子群には、PBP2X 及び PBP1A が含まれることが明らかになった。また、B1 由来の PBP2X を持つ組換え体 BAA-611(B1PBP2X) は、標準株 BAA-611 よりも高いセフチゾキシム MIC 値 (64 µg/ml) を示したが、親株のセフチゾキシム MIC 値 (≧256 µg/ml) と同等までには上昇しなかった。しかしながら、B1 由来の PBP2X 及び B1 由来の PBP1A を持つ組換え体 BAA-611(B1PBP2X, B1PBP1A) は、親株 B1 と同等のセフチゾキシム MIC 値 (≧256 µg/ml) を示し、PBP2X に加え、PBP1A に変異を獲得するとセフチゾキシムに高度耐性を獲得することが明らかになった(Kimura K., et al. JAC 2013)。

D. 考察

PRGBS の検出を促進するため、GBS を検出できる LAMP 法を開発した。本法は、特殊な機器類を必要としないため、医療施設の細菌検査室ですぐさま実施可能であり、迅速かつ安価であるため、広く普及する可能性を秘めている。しかしながら、今後は本法が、膿スワブを含めた種々の臨床検体から菌体分離の過程を経ず、直接、GBS を検出できるかなどを検討する必要がある。

今回の解析により、GBS は PBP2X に加え、PBP1A に変異を獲得することでセフチゾキ

シム高度耐性を明らかになった。このことは、複数のPBPに種々の変異を獲得し、種々のβ-ラクタム系薬に耐性を獲得してきた肺炎球菌のβ-ラクタム系薬耐性機構と類似しており、今後、GBSにおいても類似の機構により、幅広いβ-ラクタム系薬に耐性を獲得する可能性を示しており、PRGBSの動向に注意を払う必要があることを示している。

E. 結論

我々が世界に先駆けて報告した新規耐性菌であるPRGBSに関しては、我々のグループが一連の研究により知見を重ねてきたが、不明な点が未だ多々あり、十分に研究され尽くしたとは言いがたい。今後、PRGBSに関する研究をさらに拡充し、十分な解析が行われることが望まれる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Kimura, H. Yanagisawa, J. Wachino, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013)

“Rapid and reliable loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Streptococcus agalactiae*”

Japanese Journal of Infectious Diseases 66: p546-548.

2. K. Kimura, J. Wachino, H. Kurokawa, M. Matsui, S. Suzuki, K. Yamane, N. Nagano, K. Shibayama, Y. Arakawa (2013)

“High cephalosporin resistance due to amino acid substitutions in PBP1A and PBP2X in a clinical isolate of group B streptococcus”

The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68(7): p1533-1536.

2. 学会発表

1. 木村幸司、長野則之、長野由紀子、荒川宜親

“High Frequency of Fluoroquinolone- and Macrolide-resistant Streptococci among Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility”

28th International Congress of Chemotherapy and Infection (ICC), Yokohama, 2013年6月5日-8日. P119, Selected Poster Discussion PD02

(ポスター及び口頭発表)

2. 坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親 (2013)

“非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性B群連鎖球菌 (PRGBS) の解析”

第50回日本細菌学会中部支部会総会 (口頭発表) 蒲郡 10月18日19日

3. 木村幸司、長野則之、長野由紀子、外山雅美、荒川宜親 (2013)

“ペニシリン低感受性B群連鎖球菌 (PRGBS) に関する最新知見”

第87回日本感染症学会学術講演会、第61回日本化学療法学会総会 合同学会 横浜 6月5日-6日 シンポジウム29 耐性菌を科学する：グラム陽性耐性菌に関する知見のアップデート

(指定、口頭発表)

4. 坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親 (2013)

“非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性B群連鎖球菌 (PRGBS) の解析”

第42回薬剤耐性菌研究会 (口頭発表) 熱海 10月17日18日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきもの無し。

図1 GBSを検出するためのLAMPプライマーセット

プライマー	核酸配列
NEM316FIP	5'-CAG CTT AGT TAT CCC AAA TCC CAT A GAA GCA ATC ACT TTT TCA ACT CA-3'
NEM316F3	5'-AGA AGC CTT AAC AGA TGT GA-3'
NEM316BIP	5'-ATT CGC ATT TTA GAT CCA TTT GCT T GCC TTT ACA TCG TTA ACT TGA G-3'
NEM316B3	5'-CAG GAT AAG TTA AAA CCT TTT GTT C-3'
LF2	5'-TGC TTG ACT AAC CTT ATT TGC-3'
LB	5'-CAG TTG ATT CAA TTA AAG-3'

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 (黄色ブドウ球菌の薬剤耐性に関する研究)

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学／耐性菌制御学・教授）
研究協力者 山田 景子（同上・助教）

研究要旨：黄色ブドウ球菌について抗 MRSA 薬を中心に薬剤感受性を調査した。計 1978 株調査し、抗 MRSA 薬 VCM、TEIC、LZD に対し耐性を示す菌株はなかった。抗 MRSA 薬ダプトマイシン DAP は国内では 2011 年に販売された比較的新しい抗 MRSA 薬であり、国内における耐性菌の報告はこれまでないが、低感受性(MIC $\geq 2\mu\text{g/ml}$)を示す株が 1.3%の頻度で検出されその検出頻度は上市前と比べて上市後は高い傾向にあった。DAP 低感受性株の遺伝背景はほとんどが異なり、流行株は見られなかったものの長期連用による耐性度上昇も指摘されていることから低感受性株の存在も含めて周知し今後も動向を注視する必要がある。

A. 研究目的

臨床分離された黄色ブドウ球菌の中に臨床的に問題となるような薬剤耐性菌が出現あるいは拡散していないか調査を行う。特に抗 MRSA 薬ダプトマイシン(DAP)は国内では2011年に販売された比較的新しい抗 MRSA 薬であり、耐性菌の存在は国内では報告されていないが、国内での大規模な感受性データが乏しく、国内分離の臨床株について調査が必要と考えられた。解析結果について学会などで報告・周知し、耐性菌やその疫学についての理解を深め耐性菌対策を促すことを目的とした。

B. 研究方法

2010年8月～2013年10月の間に小規模医療機関を中心に全国から集められた *S. aureus* 臨床分離株 1766 株と、2003 年以前に名大病院および全国の医療機関から収集された *S. aureus* 臨床分離株 212 株の計 1978 株について抗 MRSA 薬に対する感受性を調べた。低感受性株については、分子疫学情報および耐性度の上昇に関連が疑われている遺伝子について調査した。

倫理面への配慮

患者の個人情報などは取り扱わず、菌株は連結不可能匿名化された番号により管理されており、倫理審査対象外の研究である。

C. 研究結果

バンコマイシン(VCM)、テイコプラニン(TEIC)、

リネゾリド(LZD)については全株、感性和判定された。アルベカシン(ABK)に耐性を示す株はこれまでの報告同様に散見された。DAP に対する感受性は 1978 株中 26 株で DAP の判定基準 (S: $\leq 1\mu\text{g/ml}$, I および R は基準なし)により感性和判定されない株(低感受性株; MIC $2\mu\text{g/m}$)が認められた。低感受性菌株の検出頻度を DAP の上市前と上市後で比較すると、上市前の検出頻度 0.41%は米国での上市前の大規模調査報告 (0.27%)と同程度であったが、上市後は 1.84%と増加傾向が見られた(表 1)。

表 1. DAP 上市前後の低感受性株検出頻度

	調査株数	低感受性株数 (MIC $\geq 2\mu\text{g/ml}$)	検出頻度 (%)
上市前 (~2011-9-22)	726	3	0.41
上市後 (2011-9-23~)	1252	23	1.84
全体	1978	26	1.31

低感受性菌株の遺伝学的な背景を Phage Open Reading Frame Typing (POT) 法により解析したところ、同一 POT 型を示す菌株が 2 株ずつ 4 組存在したものの、ほとんどは異なる POT 型を示した。

海外で細胞膜の電荷に変化を与え DAP の MIC 上昇に関わると報告されている、*mprF* 遺伝子配列について解析しゲノム解析株である N315 株、COL 株、MW2 株と比較したところ、12 株中 2 株にそれぞれ 1 か所のアミノ酸置換が見られたが、既報での変異個所とは異なった。残り

の菌株および新しく認められた変異による影響については今後検討が必要である。

D. 考察

DAP 低感受性株は上市前の菌株にも見られ、ある程度の頻度で存在していることが示唆された。現時点では、多くの DAP 低感受性株が異なる遺伝背景を持つ菌株であることが示唆され、流行株の存在は認められなかったものの、DAP の長期連用により耐性度が上昇することがすでに知られており、今後も低感受性株の動向に注意が必要である。

E. 結論

調査した 1978 株の中には抗 MRSA 薬 VCM、TEIC、LZD に対し耐性を示す菌株はなかった。国内ではこれまで報告がない DAP 低感受性の株が認められたが、流行株は存在していなかった。DAP 上市前に比べ上市後で検出頻度が高くなっていることから、こうした株の存在等について周知が必要であろうと思われた。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表 無し。

2. 学会発表

1) 山田景子、金万春、和知野純一、木村幸司、荒川宜親「黄色ブドウ球菌のダプトマイシン感受性」第 42 回薬剤耐性菌研究会、静岡県、平成 25 年

2) 山田景子、和知野純一、木村幸司、荒川宜親「Arbekacin resistance of *Staphylococcus aureus*」第 87 回日本細菌学会総会、愛知県、平成 26 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきもの無し

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の耐性機構の解明

（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）

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学／耐性菌制御学・教授）
研究協力者 川村 久美子（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・准教授）
後藤 謙介（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）
服部 達也（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）

研究要旨：近年、臨床分離 腸内細菌科菌種におけるプラスミド伝達性キノロン耐性(PMQR)遺伝子の保有率の増加が問題となりつつある。我々は、これまでの研究で細菌が PMQR 遺伝子(*qnrA*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*)を獲得する意義について解析を進めてきた。そして、fluoroquinolone (FQ)高度耐性大腸菌の中で主流となっている O25b:H4-ST131 株において、*qnrA* 遺伝子の獲得が ciprofloxacin (CPFX)存在下における細菌の生存延長に寄与することを見いだした。本研究では、さらに研究をすすめ、様々な血清型の FQ 感性大腸菌を用いて *qnrA* 遺伝子の獲得が細菌の生存力へ寄与することを確認するとともに、本遺伝子の獲得がキノロン耐性決定領域(QRDRs)変異の獲得ならびに FQ 耐性化の促進に影響するか否かについて解析を行った。菌株は FQ 感性大腸菌 13 株(O1, O6, O18, O25, O74, O78, OUT)を用い、それらに *qnrA* 遺伝子を形質転換にて導入し、CPFX の MIC, 最小殺菌濃度(MBC)および耐性菌出現阻止濃度(MPC)の測定を行った。全ての親株ならびに *qnrA* 導入株について、 $2 \times \text{MIC}$ または $3 \times \text{MIC}$ の CPFX 暴露時における殺菌効果曲線を作成した。O1 株および O25 株については CPFX に対する適応耐性試験もあわせて実施した。*qnrA* 遺伝子を導入した結果、CPFX の MIC, MBC, MPC はいずれも親株と比較して上昇しており、特に、O25 株における MBC および MPC は他の血清型よりも高い値を示した。*qnrA* 導入株における $2 \times \text{MIC}$ の CPFX 暴露では、O1, O6, O25 株の生存延長が認められたが、残りの菌株 (O18, O74, O78, OUT)では菌の死滅が確認された。一方、 $3 \times \text{MIC}$ の CPFX 暴露において、菌の生存が確認されたものは O25 株のみであった。適応耐性試験では、親株、*qnrA* 導入株とも継代回数に伴って CPFX の MIC が上昇した。しかし、これら適応耐性株における *gyrA* 遺伝子の QRDRs 変異は、*qnrA* 遺伝子を保有しない親株が最も早い結果となった。本研究から、低度 FQ 耐性を付与する *qnrA* 遺伝子の獲得は致死濃度の CPFX 暴露時における細菌の生存を延長させるが、必ずしも QRDRs 変異獲得および蓄積を促進させないことが明らかとなった。

A. 研究目的

臨床現場における fluoroquinolones (FQs) の使用増加に伴い、急激に FQs 耐性菌が増加している。従来、その耐性メカニズムは FQs の作用点である DNA ジャイレース (*GyrA*)およびトポイソメラーゼ IV (*ParC*)におけるキノロン耐性決定領域(QRDRs)のアミノ酸置換が主たるものであったが、新た

にプラスミド伝達性キノロン性耐性 (PMQR)遺伝子が出現し、腸内細菌科菌種の間で急速に広まりつつある。しかし、これら PMQR 遺伝子は低度 FQs 耐性を付与するに留まるため、細菌がなぜそれら遺伝子を獲得するかについて研究者の関心が集まっている。我々は、これまでの研究で細菌が PMQR 遺伝子(*qnrA*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*)を獲

得する意義について解析を進めてきた。そして、FQ 高度耐性大腸菌の中で主流となっている O25b:H4-ST131 株においては、*qnrA* 遺伝子の獲得が ciprofloxacin (CPF) 存在下における細菌の生存を延長させることを見いだした。しかしながら、本現象が各種 O 抗原に普遍的であるか否か、また FQ 高度耐性化への関与については、未だ不明のままである。本研究では、*qnrA* 遺伝子の獲得が細菌の生存力へ寄与することを様々な血清型の FQ 感性大腸菌を用いて証明するとともに、本遺伝子の獲得が QRDRs 変異の獲得ならびに FQ 耐性化の促進に影響するかどうかについて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

菌株には、FQs に感性を示す大腸菌 13 株 (O1, O6, O18, O25, O74, O78, OUT) を用いた。はじめに使用菌株の MLST 解析および PCR によるタイピングを実施した。各株に *qnrA* 遺伝子を導入後、CPF の MIC、最小殺菌濃度 (MBC) ならびに耐性菌出現阻止濃度 (MPC) を測定した。MIC 測定は Etest により、MBC および MPC は既報に従い、実施した。以後、空ベクターを各株に導入したものを親株とした。次に、全ての親株ならびに *qnrA* 導入株を対象にして、 $2 \times \text{MIC}$ または $3 \times \text{MIC}$ の CPF に暴露後の殺菌効果曲線を作成した。さらに CPF 存在下での生存延長が確認された O1 株および O25 株について、CPF に対する適応耐性試験を実施した。CPF の暴露濃度はそれぞれの菌株の $1/2 \times \text{MIC}$ に設定し、20 回の継代培養を行った。そして、得られた適応耐性株における CPF の MIC の変化を解析するとともに、*gyrA*、*parC* 遺伝子における QRDRs の塩基配列解析を行った。

C. 研究結果

MLST 解析および PCR によるタイピングの結果、大腸菌 13 株の内 7 株が ST95 と同定され、O25 株および OUT 株の 3 株は O25b-ST131 と同定された。*qnrA* 遺伝子の導入により CPF の MIC は親株と比較して 20.8-31.7 倍程上昇したが、その値は感性のままであった ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$)。また MBC および MPC も同様に *qnrA* 遺伝子の導入によって上昇しており、特に O25 株における *qnrA* 導入株の MBC および MPC はそれぞれ 0.75-1.14 $\mu\text{g/mL}$ 、3-4 $\mu\text{g/mL}$ と他の血清型よりも高い値を示した (Table 1)。

殺菌効果曲線による検討では、 $2 \times \text{MIC}$ の CPF 暴露において、親株は全て暴露開始から 48 時間経過するまでに菌が完全に死滅した。一方、*qnrA* 導入株では、O1, O6, O25 株の 6 株は暴露開始から 48 時間経過後も菌の生存が確認されたが、残りの菌株 (O18, O74, O78, OUT) は 48 時間以内に菌が完全に死滅していた (Figure 1)。 $3 \times \text{MIC}$ の CPF 暴露では、暴露から 48 時間経過後も菌の生存が確認されたものは、O25 株のみであった (Figure 2)。

CPF 存在下での生存延長が確認された O1 株と O25 株で実施した適応耐性試験では、両 O 抗原とも継代回数に伴って親株ならびに *qnrA* 導入株における CPF の MIC が上昇した。20 回継代後の親株の MIC は O1 株が 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、O25 株が 4 $\mu\text{g/mL}$ に達し、*qnrA* 導入株の MIC は O1 株および O25 株ともに 32 $\mu\text{g/mL}$ に達した (Figure 3)。適応耐性株における *gyrA* 遺伝子の QRDRs 変異はいずれの菌株でも確認され、変異によるアミノ酸置換は全て Ser83-Lue であった。変異獲得時期は O25 株の親株が 4 週目と最も早く、続いて O25 株の *qnrA* 導入株 (13 週目)、O1 の親株 (14 週目)、*qnrA* 導入株 (15 週目) の順となり、両 O 抗原ともに親株の方が早い結果となった (Table 2)。一方、*parC* 遺伝子の QRDRs 変異は、両 O 抗原ともに *qnrA* 導入株のみで継代 17 週目に確認された (Ser80-Arg/ParC)。

D. 考察

qnrA 遺伝子の獲得によって細菌は FQs に対して低度耐性を獲得すると報告されており、本研究においても、CPF の MIC、MBC および MPC の上昇は同程度であった。興味深いことに、O25 株の MBC および MPC の値は他の O 抗原よりも高く、特に MPC (3-4 $\mu\text{g/mL}$) は CPF 500 mg を 1 日 2 回経口投与した際の最高血中濃度と同程度もしくはそれを上回る値となった。従って、O25 株における *qnrA* 遺伝子の獲得は、CPF 治療下での長期間の生存を可能とし、FQ 耐性化において有利に働いているものと考えられる。

実際に、今回の殺菌効果曲線による検討では *qnrA* 遺伝子導入によって生存延長が確認された。加えて、Briales ら (Antimicrob Agents Chemother, 2011) や Allou ら (Antimicrob Agents Chemother, 2009) も同様に *qnrA* 遺伝子の獲得が CPF 存在下での細菌の生存を延長させると報告しており、細菌が致死濃度の CPF に暴露された際に、

qnrA 遺伝子の獲得が細菌の生存延長に寄与することは確からしいと考えられる。一方で、同一の ST を示す O25-ST131 株と OUT-ST131 株の間では生菌数の減少傾向に明確な差が確認されており、*qnrA* 遺伝子獲得による生存延長には、O 抗原の発現の有無が関与していることが疑われた。さらに O25-ST131 株は、唯一 3 × MIC の CPFX 暴露でも生存が確認されており、*qnrA* 遺伝子獲得による生存延長の影響を最も強く受けることが示唆された。

qnr 遺伝子の獲得は FQ 暴露時の細菌の生存を延長させる他に、FQ 耐性を促進させる働きがあると考えられてきたが、本研究の適応耐性試験において QRDRs 変異獲得時期は親株が最も早く、従来の仮説と異なる結果を示した。一方で、Cesaro ら (J Antimicrob Chemother. 2008) の解析では高濃度の CPFX や moxifloxacin による暴露において、QRDRs 変異の獲得頻度は親株の方が *qnr* 導入株よりも高いと報告しており、解析方法は異なるものの本研究の結果と傾向が一致した。このことから *qnrA* 遺伝子の獲得は、QRDRs 変異の獲得および蓄積を促進しないことが示唆された。おそらくこれは、*qnrA* 遺伝子獲得による CPFX 存在下での生存延長が、細菌にとって増殖に不利となる QRDRs 変異を早期に獲得する必要性を低くしているためであると考えられる。しかし、これらはすべて *in vitro* における解析結果であるため、今後は *in vivo* での解析が求められる。

E. 結論

本研究から、特定の血清型や遺伝的背景によって傾向は異なるものの、低度 FQ 耐性を付与する *qnrA* 遺伝子の獲得は致死濃度の CPFX 暴露時における菌株の生存を延長させるが、必ずしも QRDRs 変異獲得や蓄積を促進させないことが明らかとなった。さらに、*qnrA* 遺伝子の獲得がもたらす生存力への影響は O25 株が最も強く、これが大腸菌 O25b:H4-ST131 の世界的な蔓延の一因となっている可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

・現在、論文を投稿予定

2. 学会発表

1) Goto K., Kawamura K. and Arakawa Y. Contribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes to QRDR mutations in *Escherichia coli*. 第 86 回 日本細菌学会総会. 日本細菌学会誌. 2013. 1 第 68 巻, 189 項

2) Goto K., Kawamura K. and Arakawa Y. Contribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes to QRDR mutations in *Escherichia coli*. 第 28 回国際化学療法学会. 予稿集 52 頁

3) 後藤謙介, 川村久美子, 荒川宜親. 大腸菌のフルオロキノロン耐性獲得におけるプラスミド伝達性キノロン耐性遺伝子 *qnrA* の寄与. 第 25 回日本臨床微生物学会総会. 日本臨床微生物学雑誌. 2013.4 第 23 巻, 203 項

4) 第 87 回日本細菌学会総会 発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきもの無し

Table 1. MIC, MBC, and MPC of ciprofloxacin for the parent strains and transformants

<i>E. coli</i> strain	Serotype	MLST	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		MBC ($\mu\text{g/mL}$)		MPC ($\mu\text{g/mL}$)	
			Parent strain	Transformant	Parent strain	Transformant	Parent strain	Transformant
No. 3	O1:H12	ST95	0.008	0.19	0.016	0.285	0.19	0.75
No. 16	O1:HUT	ST95	0.012	0.25	0.018	0.5	0.19	0.75
No. 155	O6:HUT	ST92	0.006	0.19	0.006	0.475	0.19	1
No. 252	O6:HUT	ST95	0.008	0.19	0.012	0.38	0.19	0.5
No. 92	O18:H7	ST95	0.006	0.19	0.006	0.38	0.19	1
No. 286	O18:H7	ST95	0.008	0.25	0.016	0.375	0.094	0.75
No. 23	O25:H4	ST131	0.012	0.38	0.024	1.14	0.19	4
No. 41	O25:H4	ST131	0.012	0.25	0.012	0.75	0.38	3
No. 27	O74:H7	ST95	0.012	0.38	0.018	0.38	0.38	1.5
No. 205	O74:H7	ST95	0.008	0.25	0.012	0.375	0.19	0.75
No. 189	O78:H6	ST3200	0.008	0.25	0.016	0.375	0.094	1
No. 485	O78:HUT	ST23	0.008	0.19	0.012	0.38	0.094	0.75
No. 65	O18:H4	ST131	0.016	0.38	0.024	0.38	0.19	1.5

OUT, O-antigen untypable; HUT, H-antigen untypable.

* OUT strain was identified as serotype O25b by PCR using specific primer set (rfbO25b.r; 5'-TGCTATTATTATGCGCAGC-3' and rfbIbis.f; 5'-ATACCGACGACGCCGATCTG-3')

Table 2. MIC and amino acid substitutions in the QRDRs of O1-ST95 strains and O25b-ST131 strains

<i>E. coli</i> strain	No. of passages	MIC of CPFX ($\mu\text{g/mL}$)	Amino acid substitutions in the QRDRs		
			GyrA	ParC	
O1-ST95	Parent strain	P0	0.012	wt	wt
		P14	0.25	S83L	wt
	Transformant	P0	0.25	wt	wt
		P15	6	S83L	wt
		P17	32	S83L	SKOR
O25b-ST131	Parent strain	P0	0.012	wt	wt
		P4	0.38	S83L	wt
	Transformant	P0	0.38	wt	wt
		P13	4	S83L	wt
		P17	24	S83L	SKOR

wt, wild type.

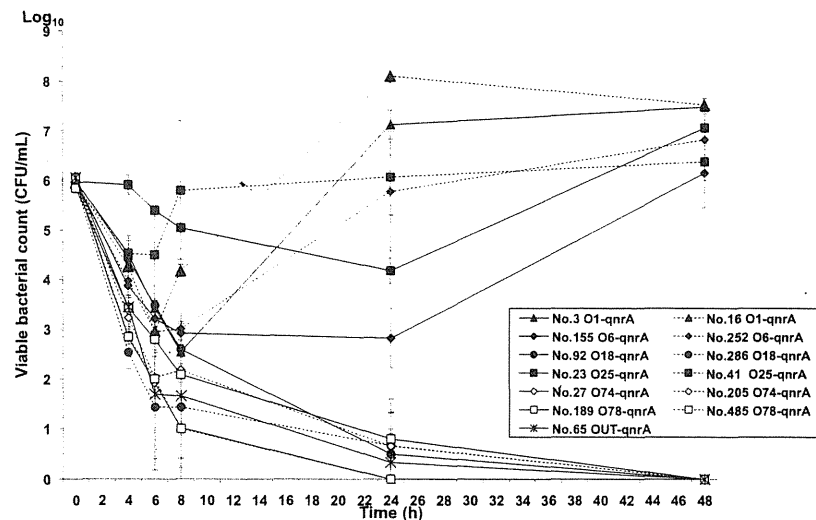


Figure 1. Viable bacterial counts in time-kill curve assays with 2 \times MIC of CPFX

Killing curve assays were performed in the LB broth containing 2 \times MIC of CPFX. All experiments were performed in triplicate, and the values reported represent the mean values. Error bars represent standard deviations (SD) of results from three experiments.

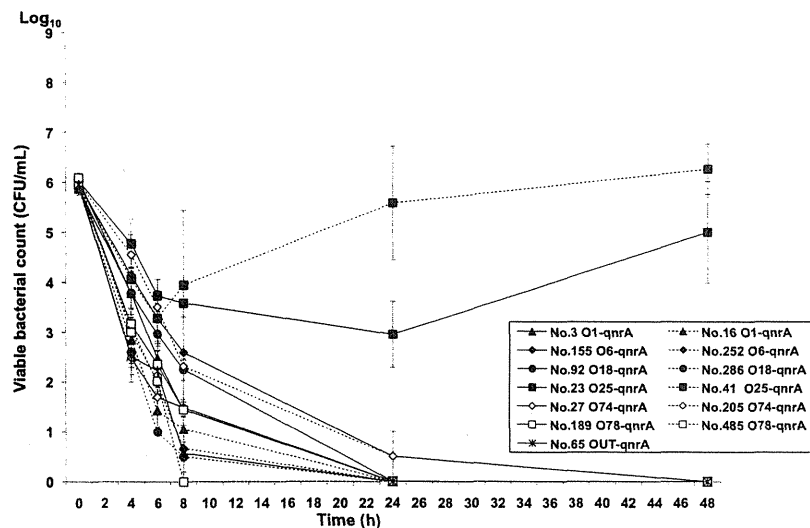


Figure 2. Viable bacterial counts in time-kill curve assays with 3 \times MIC of CPFX

Killing curve assays were performed in the LB broth containing 3 \times MIC of CPFX. All experiments were performed in triplicate, and the values reported represent the mean values. Error bars represent standard deviations (SD) of results from three experiments.

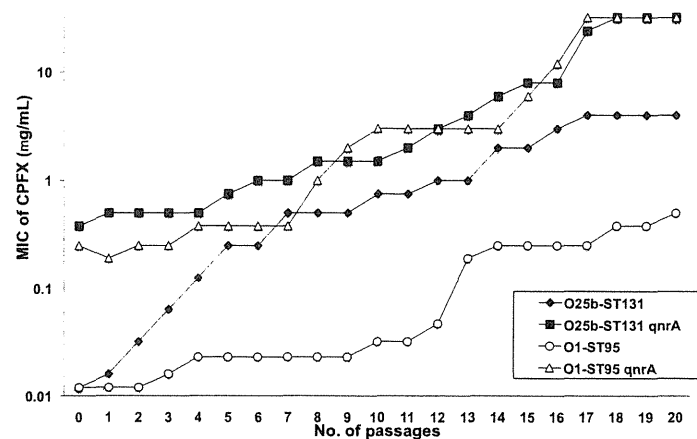


Figure 3. Adaptation to CPFX after persistent passages

Adaptation to CPFX was generated by repeated subculture in LB broth containing CPFX. The 1/2 MIC cultures were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ with shaking for 5 days, and growth was assessed visually for cultures growth in media containing CPFX. MICs of CPFX were checked, all isolates were incubated new LB broth containing CPFX. This procedure was repeated a total of 20 times every 5 days.

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

（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）

研究分担者 荒川 宜親(名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学/耐性菌制御学・教授)
研究協力者 川村 久美子(名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・准教授)
佐藤 夏巳(名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生)
中根 邦彦(名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学・院生/耐性菌制御学,
岡崎市保健所)
和知野 純一(名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学/耐性菌制御学・助教)

研究要旨：基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌の増加と多剤耐性化により薬剤の選択が困難となりつつある中、ホスホマイシンが見直されつつある。ホスホマイシンは、40 年以上前から尿路感染症などの治療に使用されてきた薬剤であり、他の薬剤との交差耐性がないこと、幅広い抗菌スペクトルを有することから、多剤耐性グラム陰性桿菌による感染症の治療薬として、その効果が期待されている。一方で、プラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子(*fosA3*, *fosC2*)がヒトや動物から検出されており、多用による耐性菌の増加が懸念されている。これまでの調査で、我々は健常人の約数%が腸管内に CTX-M 産生大腸菌を保菌していることを確認している。CTX-M 産生大腸菌についての最近の研究で、*fosA3* と *bla_{CTX-M}* が同一プラスミド上に存在することが証明されており、今後 *bla_{CTX-M}* 保有プラスミドの広まりとともにホスホマイシン耐性遺伝子の拡散が危惧されている。そこで本研究では、健常人由来 CTX-M 産生大腸菌におけるホスホマイシン耐性率およびプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子の保有について調査を実施した。2010 年 1 月～8 月の間に健常人の糞便より分離された CTX-M 産生大腸菌 138 株(重複を除く)を対象に調査を行った結果、8 株(5.8%)がホスホマイシン耐性であり、このうち 5 株が *fosA3* を保有していた。これら 5 株は接合伝達試験にいずれも *fosA3* の伝達性が確認され、得られた接合伝達株は全て親株と同型の *bla_{CTX-M}* を保有していた。Inc type は IncN type 1 株, IncFII type 2 株, IncI1 type 2 株であった。*fosA3* の周辺構造には、上流に *bla_{CTX-M}* が存在し、これら 2 つの遺伝子は IS26 に挟まれた構造であった。この構造はアジアでヒトや鶏から検出されたものと類似しており、IS26 を介して両遺伝子が様々な Inc type をもつプラスミドに伝播している可能性が示唆された。

A. 研究目的

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生菌をはじめとする多剤耐性グラム陰性桿菌の治療薬としてホスホマイシンが見直されつつある。しかし、すでにプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子(*fosA3*, *fosC2*)がヒトや動物から分離されており、また、CTX-M 産生大腸菌においては、*fosA3* と *bla_{CTX-M}* が同一プラスミド上に存在することも証明されている。これまでの調査で、我々は健常人の約数%が腸管内に CTX-M

産生大腸菌を保菌していることを確認しており、今後 *bla_{CTX-M}* 保有プラスミドの広まりとともにホスホマイシン耐性遺伝子が市中環境に拡散することを危惧している。本研究では、これら CTX-M 産生大腸菌におけるホスホマイシン耐性率およびプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子の保有率について調査を実施した。

B. 研究方法

菌株は 2010 年 1 月～8 月の間に収集した

健常人糞便由来 CTX-M 産生大腸菌 138 株を対象とした。ホスホマイシンの最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration; MIC) は CLSI に準拠した寒天平板希釈法にて測定した。ホスホマイシンに耐性を示した株 (MIC \geq 256 μ g/ml) については、PCR 法にてプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子 *fosA*, *fosA3*, *fosC2* の検索を行った。その他、接合伝達試験、multilocus sequence typing (MLST) 解析、O および H 血清型別、plasmid multilocus sequence typing (pMLST) 解析、Inc type の決定、および *fosA3* の周辺構造の解析を実施した。

C. 研究結果

138 株中 129 株 (93.5%) がホスホマイシンに感性 (MIC \leq 64 μ g/ml) を示し、1 株 (0.7%) が中間 (MIC 128 μ g/ml)、8 株 (5.8%) が耐性 (MIC \geq 256 μ g/ml) を示した (Figure 1)。このうち、ホスホマイシンに耐性を示した 8 株のうち 5 株が *fosA3* を保有していたが、*fosA* および *fosC2* 保有株は認められなかった。接合伝達試験の結果、これら 5 株全てにおいて *fosA3* の伝達性が確認され、得られた接合伝達株は親株と同型の *bla*_{CTX-M} を保有していた。MLST 解析の結果、ST155, ST224, ST3502, ST3503, ST3504 と多様性があり、血清型についても偏りは認められなかった (Table 1)。Inc type は IncN type 1 株、IncII type 2 株、IncFII type 2 株であり、pMLST 解析の結果、IncII type のプラスミドは ST71 および ST97、IncFII type は FII:2 および FII:33 であった (Table 1)。

fosA3 の周辺構造解析は、Inc type の異なる 3 株 (No. 48, No. 558, No. 559) について実施した (Figure 2)。IncN type のプラスミド (No. 48) および IncII type のプラスミド (No. 559) は *fosA3* の上流に Δ IS903, *bla*_{CTX-M-14}, Δ ISEcp1 が存在し、この構造は ECO021TF のプラスミド (Accession nos. JQ343849) と 99% 一致していた。一方、*fosA3* の下流は *Klebsiella pneumoniae* 342 の染色体と 78% 一致していた。これらの構造はその両端を IS26 によって挟まれていた。IncFII type のプラスミド (No. 558) は *fosA3* の上流に Δ *bla*_{TEM-1}, *orf477*, *bla*_{CTX-M-55}, Δ ISEcp1 が存在し、これらは IS26 に挟まれた構造であった。この構造は ECO141TF のプラスミド (Accession nos. JQ343851) と 100% 一致していた。一方、*fosA3* とその下流は IS26 に挟まれており、*fosA3* の下流は *K. pneumoniae* 342 の染色体と 79% 一致していた。これら

fosA3 の周辺構造はヒトや家畜より分離された *fosA3* 保有 CTX-M 産生大腸菌の周辺構造と 98-100% 一致していた。

D. 考察

健常人由来 CTX-M 産生大腸菌を対象に、ホスホマイシン耐性率を調査したところ、5.8% がホスホマイシンに耐性であった。これは日本 (3.6%)、スペイン (9.1%) および韓国 (4.2%) の臨床報告 (Antimicrob Agents Chemother 2010; J Antimicrob Chemother 2009, J Antimicrob Chemother 2012) と類似している。この結果から、ホスホマイシンや第三世代セファロスポリン系抗菌薬などの抗菌薬投与歴が無い健常人の腸管内においてもホスホマイシン耐性 CTX-M 産生大腸菌が保菌されていることが確認された。

ホスホマイシン耐性 CTX-M 産生大腸菌の *fosA3* 保有率は 62.5% (5/8) と高く、さらに様々なグループの CTX-M 型 β -ラクタマーゼ遺伝子と *fosA3* が同時に存在していたことから、今後、腸内細菌科菌種における *bla*_{CTX-M} 遺伝子の広まりとともに *fosA3* が拡散する可能性が示唆された。しかし、*fosA3* 保有 CTX-M 産生菌の調査報告は韓国や中国など東アジア諸国に限られているため、今後はヨーロッパやアメリカなど世界規模での調査が必要となると考える。

fosA3 保有株の血清型、ST は多様性があり、韓国の報告とは異なっていた。また、Inc type についても偏りは認められなかったことから、*fosA3* は様々な Inc type のプラスミドに伝播し、遺伝的背景の異なる菌株間に伝播することが示唆された。

fosA3 の周辺構造は、3 株とも共通して、*fosA3* の上流に *bla*_{CTX-M} が存在し、これら 2 つの遺伝子が IS26 に挟まれる構造であった。この構造はヒト、家畜およびペットより分離された *fosA3* 保有 CTX-M 産生大腸菌の周辺構造と類似していたことから、*fosA3* が IS26 を介して様々なプラスミドに伝播し、臨床、市中、家畜やペットなど様々な環境下に生息している菌の間で、すでに広まっていることが明らかになった。

E. 結論

我々は健常人糞便由来 CTX-M 産生大腸菌に *fosA3* 遺伝子が広まりつつあることを証明した。ホスホマイシンは CTX-M 産生大腸菌感染症の治療薬として再評価されつつあるが、健常人の腸管内に保菌される大

腸菌がすでにプラスミド性ホスホマイシン耐性遺伝子を獲得していたことから、今後、ホスホマイシンの使用増加に伴う *fosA3* の広まりが危惧される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato N., Kawamura K., Nakane K., Wachino J. and Arakawa Y. First detection of fosfomycin resistance gene *fosA3* in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy individuals in Japan. *Microb. Drug Resist.* 2013. 19(6): 477-482.

2. 学会発表

1) 佐藤夏巳, 川村久美子, 後藤謙介, 和知野純一, 中根邦彦, 荒川宜親. 健常人より分離された CTX-M 産生大腸菌におけるプラスミド性 fosfomycin 耐性遺伝子 *fosA3* の広まり. 第 86 回 日本細菌学会総会. 日本細菌学会雑誌. 2013. 1 第 68 巻, 188 頁

2) 佐藤夏巳, 川村久美子, 中根邦彦, 和知野純一, 荒川宜親. 健常人より分離された CTX-M 産生大腸菌におけるプラスミド性 fosfomycin 耐性遺伝子 *fosA3* の広まり. 第 87 回 日本感染症学会学術講演会/第 61 回 日本化学療法学会総会 合同学会. 感染症学雑誌. 2013. 5 第 87 巻, 238 頁

3) Sato N., Kawamura K., Nakane K., Wachino J. and Arakawa Y. First detection of acquired fosfomycin resistance gene *fosA3* among CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from healthy Japanese people. 第 28 回 国際化学療法学会. 予稿集 52 頁

4) 佐藤夏巳, 川村久美子, 中根邦彦, 和知野純一, 荒川宜親. 健常人より分離された CTX-M 産生大腸菌におけるプラスミド性 fosfomycin 耐性遺伝子 *fosA3* の広まり. 第 25 回 日本臨床微生物学会総会. 日本臨床微生物学雑誌. 2013. 4 第 23 巻, 297 頁

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきもの無し