

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究

研究分担者	切替 照雄	((独)国立国際医療研究センター研究所・感染症制御研究部・部長)
研究協力者	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	(株式会社 BML 総合研究所・検査本部・次長)

研究要旨

本研究の目的は、多剤耐性緑膿菌の院内感染の実態を明らかにすること、ならびに、多剤耐性緑膿菌臨床分離株より流行型の薬剤耐性因子を同定し、それらを標的とする多剤耐性菌の迅速検出法を開発することである。本年度は、2012年に分離された多剤耐性緑膿菌から同定された IMP-type MBL 変異体 IMP-34 および IMP-41 の解析を行うと共に 2013 年度に分離された多剤耐性緑膿菌のスクリーニングを行なった。さらに、2012 年度に得られた多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株の分子疫学解析を行った。AAC(6')-Ib、AAC(6')-Iae および IMP-type メタロ-ラクタマーゼ産生多剤耐性緑膿菌の迅速診断イムノクロマトキットの開発により、日本で分離される産生多剤耐性緑膿菌の約 8 割を迅速診断可能となった。これらの迅速診断キットの普及により、院内感染対策として多剤耐性緑膿菌のモニタリングならびに早期検出に有効であることが期待される。

A. 研究目的

近年、各地の医療施設において多剤耐性緑膿菌の分離報告及び院内感染報告が多数見受けられる。高度多剤耐性緑膿菌は、アミノグリコシド薬、ニューキノロン薬、カルバペネム薬に高度耐性を示し、治療が極めて困難であると共に、個々の施設内での感染伝播を引き起こす。今日の医療提携システムのもとでは、施設を超えて広域に伝播拡大していくことも懸念されている。そのため、感染拡大の防止及び対策を講じ、医療の質と信頼を確保するために、高度多剤耐性緑膿菌の院内分離状況を把握する必要がある。本研究では、多剤耐性緑膿菌の

分子疫学解析を行なうことにより重要な薬剤耐性因子を同定し、同菌の早期検出やモニタリングに有用な簡便かつ迅速な薬剤耐性菌検出法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. IMP-type MBL 変異体 IMP-34 および IMP-41 の解析

2012 年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株 191 株に対し、我々の開発した IMP 産生緑膿菌迅速診断キットを用いて IMP 産生菌をスクリーニングした。イムノクロマト陽性菌からゲノムを抽出し、IMP の亜型を PCR およびシーケンスで確認した。

IMP variant は大腸菌にクローニングし、薬剤耐性を解析するとともに、タンパク質精製し、酵素活性を測定した。

2. 2013 年多剤耐性緑膿菌臨床分離株の迅速診断

2013 年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株 300 株に対し、AAC(6')-Ib、AAC(6')-Iae および IMP-type メタロ-ラクタマーゼ産生緑膿菌迅速診断キットを用いてこれらの酵素の産生を確認した。また、IMP-type においてはシークエンスにより亜型を判定した。

3. 日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析

2012 年に分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株からゲノムを抽出し、次世代シークエンスを用いて全ゲノム配列を決定した。全ゲノム配列から薬剤耐性因子を同定すると共に、SNP を抽出し系統解析を実施した。

倫理面への配慮

研究対象は、患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用する。本研究内容は、疫学研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省）の対象外である。

C. 研究結果

1. IMP-type MBL 変異体 IMP-34 および IMP-41 の解析

2012 年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株から IMP-34 産生株 3 株および IMP-41 産生株 1 株が分離された。

IMP-34 は IMP-1 とのアミノ酸比較で 1 アミノ酸置換(Glu126Gly)が、IMP-41 は IMP-11 とのアミノ酸比較で 1 アミノ酸置換 (Val67Phe) が見られた。

大腸菌にクローニングし、薬剤耐性を比較すると、IMP-34 は IMP-1 に比べ、doripenem, imipenem および meropenem を含むカルバペネム系薬に対して感受性で、cefepime に対して耐性を示した。IMP-41 は IMP-11 に比べ、ampicillin, ampicillin/jsulbactam, cefepime, ceftazidime, doripenem および meropenem に対して耐性を示した (Table 1)。

酵素活性を比較した結果、IMP-1 と IMP-34 では k_{cat}/K_m 値に大きな差は見られなかったが、IMP-41 は IMP-11 より penicillin G, ampicillin, cephradine および ceftazidime において k_{cat}/K_m 値が低く、cefotaxime, ceftazidime, doripenem および meropenem において k_{cat}/K_m 値が高かった (Table 2)。

2. 2013 年多剤耐性緑膿菌臨床分離株の迅速診断

日本の医療施設で分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株 300 株を IMP-type メタロ-ラクタマーゼ、AAC(6')-Ib および AAC(6')-Iae 産生緑膿菌迅速診断キットを用いてこれらの酵素の産生を確認した結果、IMP 陽性株 169 株 (56.3%)、AAC(6')-Ib 陽性株 91 株 (30.3%)、AAC(6')-Iae 陽性株 131 株 (43.7%) であった。

IMP のタイピングをシークエンス解析により行ったところ、IMP-1, -6, -7, -10, -34, -41, -43 が検出された。カルバペネムにより耐性を示す IMP-41 および IMP-43 はそれぞれ 2 県から 2 株、3 県から 5 株検出された。

3. 日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析

日本の医療施設 (7 県、12 医療施設) (Fig. 1) から分離された多剤耐性アシネトバクター 49 株において種々の薬剤に対する MIC を調べたところ、アミノグリコシド系薬に対する MIC が全ての株で高度耐性を示した (Table 3)。全ゲノム解析を行った結果、全ての株から 16S rRNA methylase ArmA をコードする遺伝子 *armA*、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 *aac(6')-Ib* が検出された。さらに、山口県の 2 医療施設から分離された 4 株においてはカルバペネム系薬に対し MIC >64 μ g/ml 以上の高度耐性を示し、blaOXA-72 を保有していた。

分子系統解析の結果、大きく 3 つの clade に分かれ、シークエンスタイピング (ST)

208 を示す clade、ST455 を示す clade および ST512 を示す clade に分かれた (Fig. 2)。blaOXA-72 保有株 4 株は ST512 clade に分類された。

また、ゲノム解析から *armA* 遺伝子はクロモソームに存在していることが明らかとなった。

D. 考察

1. IMP-type MBL 変異体 IMP-34 および IMP-41 の解析

IMP-1 と IMP-34 のアミノ酸比較では 126 番アミノ酸が Glu から Gly に変化していた。この変化による酵素活性の違いは認められなかったことから、この部位のアミノ酸置換は酵素活性への影響はほとんどないと考えられる。

IMP-11 と IMP-41 のアミノ酸比較では 67 番アミノ酸が Val から Phe に変化していた。この変異は酵素活性に大きく影響していると考えられた。SubclassB1 に属する MBL の 60 から 66 番アミノ酸残基は基質との相互作用に重要な active loop を形成することが分かっている。67 番目アミノ酸はこの active loop に隣接していることから、この変異が酵素活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

2. 2013 年多剤耐性緑膿菌臨床分離株の迅速診断

過去、我々の開発した 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ると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。これらの迅速診断キットの普及により、院内感染対策として多剤耐性緑膿菌のモニタリングならびに早期検出に有効であることが期待される。

近年の解析から AAC(6')-Ib 産生菌の割合やカルバペネムに対してより耐性を示す IMP の出現が報告されていることから、今後も継続的なモニタリングをしていく必要がある。

3. 日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析

2012 年に分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株は全て高度アミノグリコシド耐性を示し、16S rRNA methylase ArmA をコードする遺伝子 *armA* が検出された。過去、日本で *armA* 遺伝子を保有するアシネトバクターバウマニーの報告は少なく、高頻度での分離報告はない。

高度アミノグリコシド耐性に寄与する 16S rRNA methylase 産生菌の報告は、中国、韓国、東南アジア諸国で多く報告されている。よって、これらの国々から日本に持ち込まれた可能性が高いと考えられる。

今後も持続的なモニタリングを続けると共に、16S rRNA methylase 産生高度アミノグリコシド耐性菌を迅速に検出できるシステムを開発する必要があると思われる。

E. 結論

本研究から、我々の開発した迅速診断キットを用いることで日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約 8 割が迅速に検出可能であることが分かった。また、カルバペネム系薬に対してより高い耐性を示す IMP-type MBL の新興も明らかとなった。さらに、我々の行った日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析から、高度アミノグリコシド耐性を付与する 16S rRNA メチラーゼ産生株の出現が明らかとなった。以上のことから、今後、より詳細なモニタリングが必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, **Kirikae T**. Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):96-100.
- 2) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Sah MK, Ohara H, **Kirikae T**, Pokhrel BM. NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain

isolated in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 May;57(5):2394-2396.

- 3) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, Phuong DM, Thu TA, Binh NG, Anh NQ, Nga TT, Truong PH, Xuan PT, Thu LT, Son NT, **Kirikae T**. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infect Dis.* 2013 May;13(1):251.
- 4) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, **Kirikae T**. IMP-43 and IMP-44 metallo- β -lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Sep; 57(9):4427-4432.
- 5) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Shimada K, **Kirikae T**, Pokhrel BM. Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Oct;42(4):372-374.
- 6) Hamada Y, Watanabe K, Tada T, Mezaki K, Takeuchi S, Shimizu T, **Kirikae T**, Ohmagari N. Three cases of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* blood stream infection in Japan. *J Infect Chemother.* 2013 Oct; 19(5): 956-958.
- 7) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Sah MK, Ohara H, Shimada K, **Kirikae T**, Pokhrel BM. NDM-1 Metallo-beta-Lactamase and ArmA 16S rRNA methylase producing *Providencia rettgeri* clinical isolates in Nepal. *BMC Infect Dis.* 2014 Feb;14(1):56.
- 8) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, **Kirikae T**. Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and emergence of OXA-72 carbapenemase-coproductors in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* In press.

2. 学会発表

- 1) 多田達哉・秋山徹・切替照雄. 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の分子疫学解析、第86回日本細菌学会総会、平成25年3月、幕張
- 2) 多田達哉・秋山徹・島田佳世・小原博・Pokhrel M Bharat・切替照雄. ネパールの医療施設で分離された院内感染起因菌としても多剤耐性グラム陰性菌の解析、第42回薬剤耐性菌研究会、平成25年10月、熱海
- 3) Teruo Kirikae. Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and emergence of OXA-72 carbapenemase-coproductors in Japan. Japan-Korea Symposium, The 25th Annual Meeting of Japanese Society for Clinical Microbiology、平成26年2月、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

TABLE 1 MICs of β -lactams for *P. aeruginosa* NCGM, *E. coli* strains transformed with IMP-1, IMP-7, IMP-7', IMP-11 and IMP-11'

Antibiotic(s) ^a	<i>E. coli</i> DH5 α (pHSG398/IMP-1)	<i>E. coli</i> DH5 α (pHSG398/IMP-34)	<i>E. coli</i> DH5 α (pHSG398/IMP-11)	<i>E. coli</i> DH5 α (pHSG398/IMP-41)	<i>E. coli</i> DH5 α (pHSG398)
	Ampicillin	32	32	16	4
Ampicillin-Sulbactam	16	16	8	2	1
Aztreonam	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
Cefepime	2	2	8	4	2
Cefotaxime	16	16	32	128	<0.25
Cefoxitin	512	512	>512	128	2
Cefozopran	4	4	16	16	<0.25
Cefpirome	0.25	0.5	2	1	<0.25
Ceftazidime	512	512	128	256	<0.25
Ceftriaxone	64	64	64	128	<0.25
Cefuroxime	256	128	512	512	4
Cephadrine	256	256	256	64	16
Doripenem	0.25	<0.25	2	4	<0.25
Imipenem	0.5	0.25	1	1	<0.25
Meropenem	0.5	0.25	2	8	<0.25
Moxalactam	64	64	128	128	<0.25
Penicillin G	128	128	64	32	32
Piperacillin	2	2	2	2	2
Piperacillin/Tazobactam	1	1	1	1	1

^aThe ratio of the ampicillin to sulbactam was 2:1. The ratio of piperacillin to tazobactam was 4:1. The ratio of ticarcillin to clavulanic acid was 15:1.

TABLE 2 Kinetic parameters of β -lactamase IMP-1, IMP-34, IMP-11 and IMP-41 with various substrates

Substrate	K_m (μM) ^a				k_{cat} (s^{-1}) ^a				k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) ^a			
	IMP-1	IMP-34	IMP-11	IMP-41	IMP-1	IMP-34	IMP-11	IMP-41	IMP-1	IMP-34	IMP-11	IMP-41
Penicillin G	662	423	290	280	94	49	12	2.2	0.14	0.12	0.042	0.0077
Ampicillin	340	355	423	334	16	13	6.1	1.7	0.048	0.037	0.014	0.0052
Cephadrine	73	57	27	100	21	15	14	6.2	0.29	0.26	0.52	0.062
Cefoxitin	34	31	17	32	2.7	2.0	3.2	1.1	0.080	0.066	0.19	0.034
Cefotaxime	14	10	12	6.1	2.9	2.0	3.3	12	0.20	0.20	0.27	1.9
Ceftazidime	26	22	49	45	0.68	0.4	0.98	3.5	0.026	0.019	0.020	0.076
Cefepime	21	29	12	93	1.4	2.4	1.5	8.6	0.064	0.084	0.12	0.093
Aztreonam	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b
Dripenem	39	39	12	2.6	4.8	3.8	3.5	3.3	0.12	0.096	0.3	1.3
Imipenem	58	59	18	136	6.9	4.9	4.2	22	0.12	0.083	0.24	0.16
Meropenem	37	46	27	17	2.3	2.0	2.6	4.4	0.062	0.043	0.095	0.27

^aThe K_m and k_{cat} values represent the means of three independent experiments \pm standard deviations.

^bNH: no hydrolysis was detected under conditions with a substrate concentration of up to 1mM and an enzyme concentration of up to 700nM.

**49 isolates of multidrug-resistant *A. baumannii*
(July 2012 - December 2012)**

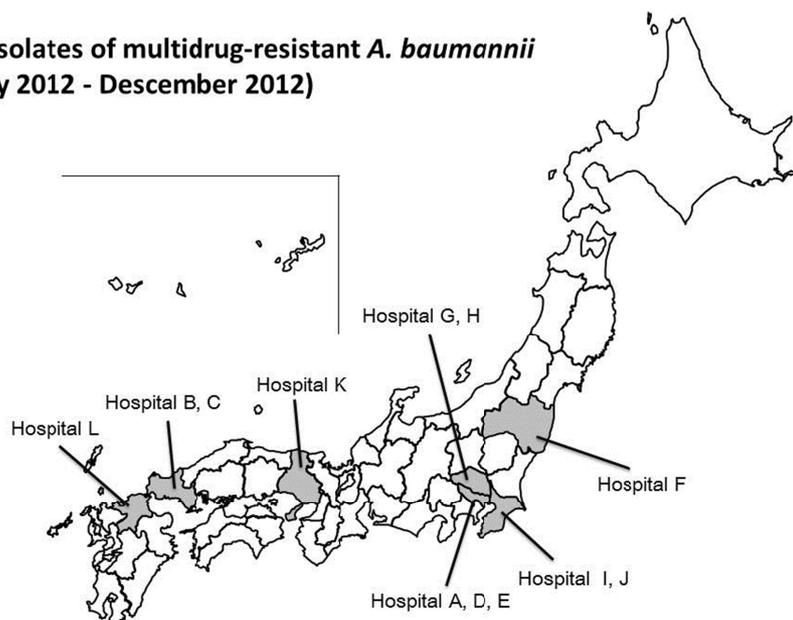


Fig. 1. Geographic distribution of 12 medical settings in Japan

TABLE 3. MIC₅₀ and MIC₉₀ values and percent antimicrobial resistance of *A. baumannii* clinical isolates

Antimicrobial agent	<i>A. baumannii</i> (n=49)				
	Breakpoint for resistance ^a (µg/ml)	% Resistance	Range (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)
Amikacin	≥64	100	>1,024	>1,024	>1,024
Arbekacin	-	-	1,024->1,024	>1,024	>1,024
Colistin	≥4	8	≤0.25-4	2	2
Ciprofloxacin	≥4	100	32-1,024	256	512
Gentamicin	≥16	100	512->1,024	>1,024	>1,024
Imipenem	≥16	100	16-64	16	64
Meropenem	≥16	100	16-128	16	128
Tigecycline ^b	-	-	≤0.25-4	1	4

^aBreak points for antimicrobial resistance were determined according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (M07-A9).

^bMICs to tigecycline were 4 µg/ml for 6 isolates, 2 µg/ml for 7, 1 µg/ml for 18, 0.5 µg/ml for 12, and ≤0.25 µg/ml for 6.

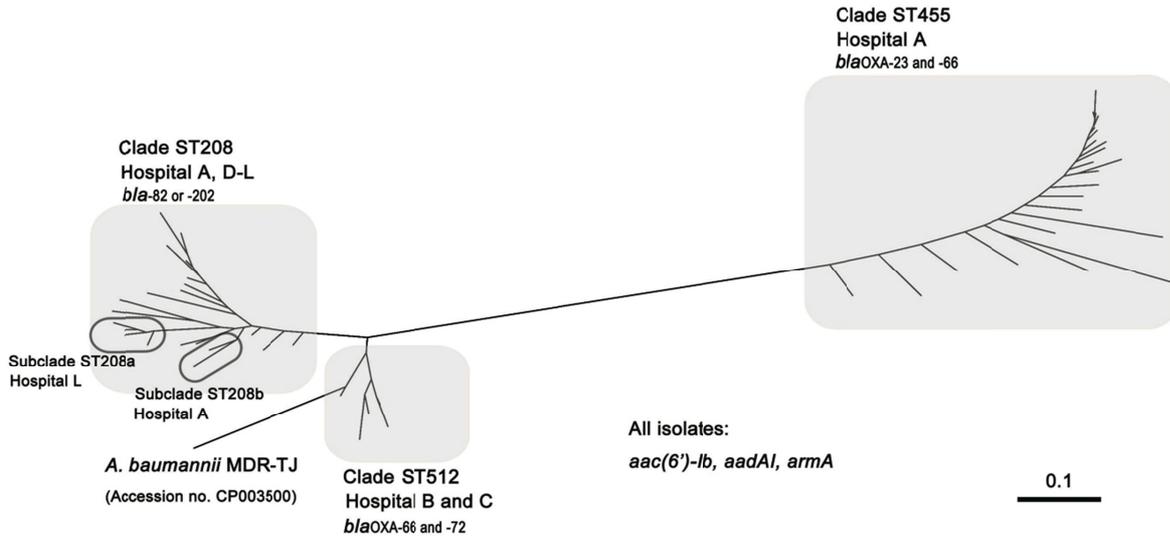


Fig. 2. Molecular phylogeny of the 49 *A. baumannii* strains. Molecular phylogenetic analysis based on SNP concatenation revealed that the 49 isolates were clustered into 3 clades, with the ST208 clade composed of 2 subclades.