

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）
アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究

結核菌の薬剤耐性 Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (Taiwan CDC)
NDM-1 型薬剤耐性菌 NDM-1 carbapenemase-producing bacteria (Vietnam NIHE)

研究分担者 柴山 恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部)
Keigo Shibayama (Department of Bacteriology II, NIID)

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 *katG* 遺伝子の変異で、かつ耐性との関連が明らかにされていない 235 番目の GA の挿入、C1436A、C317T、G332A の変異を見出した。C317T、G332A の変異は、酵素の活性中心のアミノ酸残基を置換させることで酵素活性に影響を与えていることが分かった。今後、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輸入事例を中心に 10 例ほど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 遺伝子陽性の *Acinetobacter baumannii* 4 株、大腸菌 5 株、*Klebsiella pneumoniae* 4 株、*Enterobacter cloacae* 1 株、*Citrobacter freundii* 1 株、及び日本で分離された *K. pneumoniae* 1 株を用いて、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 NDM 型カルバペネマーゼ産生菌検出に応用できるか検証した。メロペネム、セフトジジム、及び SMA ディスクの組み合わせで検出が可能であることが分かった。

The emergence of drug resistant tuberculosis is a public health concern. The resistance to isoniazid (INH) can be detected by a convenient PCR-based amplification and reverse blotting assay. However, discordant results have been observed for several resistant strains isolated in Taiwan. Some INH resistant strains carried new mutations, C1436A, C317T, G332A, and insertion of GA at 235 of *katG* gene. Among them, C317T and G332A were shown to be associated with alteration of enzyme activity by *in silico* analysis.

The collaborative study with NIHE aimed at evaluating the SMA test for detecting NDM-1 producers among *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. A collection of 16 NDM-1-positive bacterial isolates (5 *Escherichia coli*, 4 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Enterobacter cloacae*, 1 *Citrobacter freundii*, and 4 *A. baumannii*), obtained from hospitals in Vietnam in 2010, and 1 *K. pneumoniae* isolated in Japan in 2010, were used. SMA test using both MPM and CAZ disks was shown to be the most suitable for screening carbapenem-resistant isolates for NDM-1-type MBL producers.

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)

Collaborators in Japan:

Shigetarou Mori, Department of Bacteriology II, NIID
Hyun Kim, Department of Bacteriology II, NIID
Mari Matsui, Department of Bacteriology II, NIID
Masato Suzuki, Department of Bacteriology II, NIID
Satowa Suzuki, Department of Bacteriology II, NIID
Jun-ichi Wachino, Department of Bacteriology, Nagoya University

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 で収集されたこれらの株を用いて感染研で新たな遺伝子変異を見出すとともに、それらの変異が実際に耐性に関与しているかどうかについても感染研で解析することとした。NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、2008 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輸入事例を中心に 10 例ほど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。今年度は、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広く用いられている SMA ディスク法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌の検出にも応用できるかどうか検証することとした。

B. 研究方法

台湾 CDC においては、INH 耐性結核菌を収集し、加熱死菌を感染研に送付し、感染研ではゲノム DNA を抽出したのち、*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 法で NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子を検出した。分離された NDM 型遺伝子陽性の *Acinetobacter 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、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 ディスク法で SMA による阻害効果が見られるかを観察し、この方法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌のスクリーニングに応用できるか検証した。

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株について加熱死菌を感染研に送付してもらった。感染研にて、ゲノム DNA を抽出した後、*katG* 遺伝子、*ndh* 遺伝子の変異をスクリーニングした。結果を Table 1 に示す。これまでに報告が無い新規の変異で新たに見つかったのは、*katG* 遺伝子の 235 番目の GA の挿入、C1436A、C317T、G332A だった。これらは、アミノ酸残基では挿入によるものは frame shift、塩基の mutation のものでは Ala106Val、Gly111Asp に相当する。*In silico* 解析で、これらのアミノ酸残基は、蛋白の活性中心に存在することが分かった(図 1 A, B)。

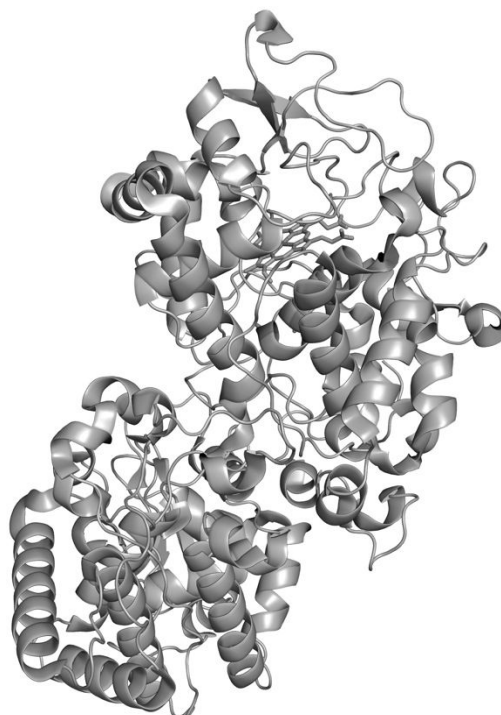


図 1 A、KatG 全体像

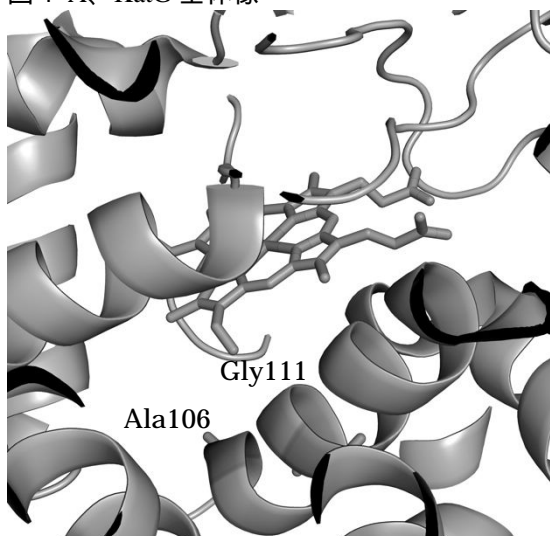


図 1 B KatG の活性中心部分

このことから、これらの変異は KatG 蛋白の酵素活性に影響を与えていることが推測された。

ベトナムハノイ市内の医療機関で分離された 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ラジウム(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 1 4 株、MPM では 1 5 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。

D. 考察

結核菌の INH 耐性株で、これまでに報告がない *katG* 遺伝子の変異を見いだした。INH は菌体内に取り込まれた後、KatG 蛋白により代謝され活性形に変換される。*In silico* による 3 次元構造の解析から、これらの変異により KatG 蛋白の活性が失われることで INH 耐性が誘導されていると推測された。今後、実際に蛋白を精製し、活性の測定を行う予定である。これらの変異が実際に耐性に関与していることを確認した上で、現行の INH 耐性結核菌を検出する検査法の改良につなげる予定である。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌については、従来推奨されていた CAZ ディスクに MPM ディスクを組み合わせる事で、検出が出来る事が分かった。ここで、SMA ディスク法は NDM 型カルバペネマーゼ産生菌だけでなく、IMP 型や VIM 型など他のメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌も検出する。SMA ディスク法は安価で簡便なため、本法をまずスクリーニングとして用い、PCR 等で遺伝子を確定することで、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌を効率的に検出出来ると考えられる。

E. 結論

台湾で分離された INH 耐性結核菌において *katG* 遺伝子に新たな遺伝子変異を見いだした。

NDM 型カルバペネマーゼ産生菌のスクリーニングに、SMA ディスク法が応用出来る事が分かった。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Evaluation of a Double-Disk Synergy Test with a Common Metallo-beta-Lactamase Inhibitor, Mercaptoacetate, for Detecting NDM-1-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*.

Wachino J, Matsui M, Tran HH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K. *Jpn J Infect Dis*. 2014;67(1):66-8.

- 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(2013年7月現在)

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) 34:238-9, 2013.

2. 学会発表

- 1) SMA ディスク法を使った 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
松井真理 和知野純一 鈴木里和 柴山恵吾
第 25 回日本臨床微生物学会総会、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
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

Table 1.

No. of isolates	Mutation		Codon	Amino Acid	Notes
	Gene	Nucleotide No.			
1	<i>katG</i>	G→T position 388	CGG→CTG	Arg463Leu	
2	<i>katG</i>	T→C position 271	TGG→CGG	Trp91Arg	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
3	<i>katG</i>	G and A inserted after position 235 -		Frameshift	novel mutation
7	<i>katG</i>	A→G position 413	AAC→AGC	Asn138Ser	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
8	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
	<i>katG</i>	C→A position 1436	GCG→GAG	Ala479Glu	novel mutation
	<i>ndh</i>	T→C position 203	ATC→ACC	Ile68Thr	novel mutation*
10	<i>katG</i>	A→C position 884	CAG→CCG	Gln295Pro	
	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
11	<i>katG</i>	C→T position 317	GCG→GTG	Ala106Val	novel mutation
		G→A position 332	GGC→GAC	Gly111Asp	novel mutation
		G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
12	<i>katG</i>	G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	
13	<i>katG</i>	C→T position 357	CGC→CGT	Arg119Arg (silent)	
		G→T position 1388	CGG→CTG	Arg463Leu	

*H24 年報告済。

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*