

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、*ahpC* の C-10T、*ndh* の T203C の変異を見出した。C317T、G332A の変異は、*in silico* の解析から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を低下させ、INH の活性化を阻害して耐性化に関与し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 型カルバペナーゼ産生菌は、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りに分離されている。ベトナムで分離された NDM 型遺伝子陽性菌株を用いて、従来メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の迅速検出法として用いられてきた SMA ディスク法が NDM 型カルバペナーゼ産生菌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出来ることが分かった。またベトナムで分離された NDM 型遺伝子陽性 *Acinetobacter baumannii* 12 株について、Multilocus sequence typing 法により遺伝子型を調べたところ、うち 11 株は非流行タイプだった。ベトナムでは院内感染に関する対策が十分でないことが背景として考えられる。日本国内においては、途上国に旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に入院する患者について、特に NDM 型のような外国で蔓延している耐性菌について注意を払う必要があると考えられる。

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, C-10T of *ahpC* gene, C1436A, C317T, G332A, and insertion of GA at 235 of *katG* gene, and T203C of *ndh*. Among them, C317T and G332A of *katG* gene 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-type MBL producers. We further determined genotype of NDM-type carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in hospitals in Vietnam by multilocus sequence typing (MLST). Among 12 NDM-positive *A. baumannii* strains examined, 11 belonged to MLST types different from the clonal complex 92 which is known as the worldwide epidemic lineage. This is in contrast to the situation in Japan where OXA-type carbapenemase-producing CC92 type strains are dominant and cause nosocomial infections.

#### 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

### 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。ベトナム NIHE との共同研究では、これまでメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を簡便に検出する SMA ディスク法が NDM 型カルバペネマーゼ産生菌にも応用できるかどうか検証することとした。また収集した NDM 型カルバペネマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* の遺伝子型別を行い、どのような型が拡散しているのかを調べる事とした。

### 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、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌を分離した。分離された NDM 型遺伝子陽性の *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、従来メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の迅速検出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に応用できるか検証した。また、NDM 型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* 12 株について Multilocus sequence typing (MLST)により遺伝子型別を行った。

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、*ahpC* の C-10T、*ndh* の T203C の変異だった。うち、*katG* 遺伝子で挿入によるものは frame shift、塩基の mutation のものではアミノ酸残基で Ala106Val、Gly111Asp の変異に相当する。*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)。

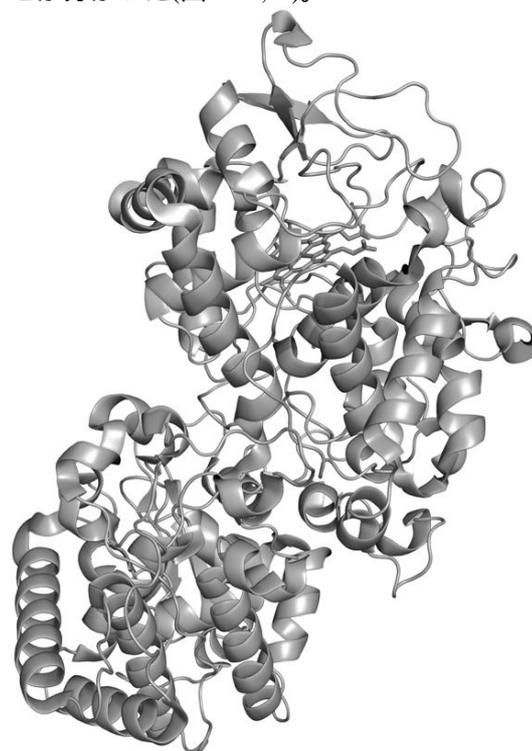


図 1 A、KatG 全体像

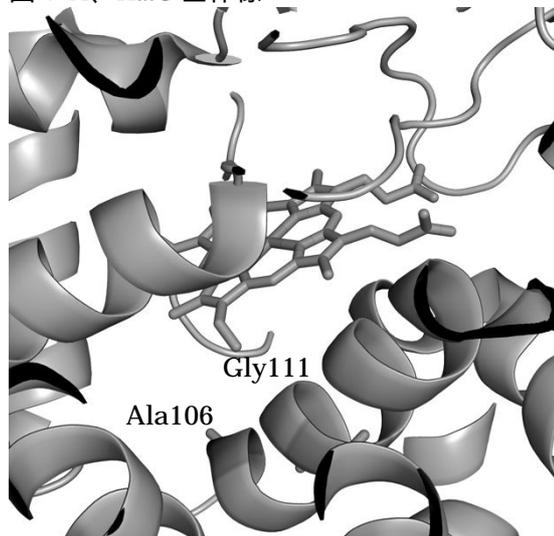


図 1 B KatG の活性中心部分

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 の阻害効果が認められ、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 SMA による阻害効果が認められ、陽性と判定された。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 いずれでも検出できなかったと考えられる。そして OXA-48 型カルバペネマーゼは CAZ の分解能が低く、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。また、ベトナムで分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* 12 株の MLST 型別を行った。*A. baumannii* は、MLST により世界的な流行タイプ CC92 とそれ以外のものに分けられる。CC92 は、多剤耐性株が多く、また特に院内感染を起こしやすいという特徴がある。日本国内で院内感染によるアウトブレイクを起こすのは、ほとんどの場合 CC92 タイプである。ベトナムで分離された NDM 産生株 12 株の MLST 型を調べたところ、11 株が non-CC92 タイプだった。

#### 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 ディスクに加えて MPM ディスクを使用する事で、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陽性となる。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。NDM 型耐性菌については、

日本ではまだ稀であるものの、ベトナムでは医療機関で蔓延状態にあることが分かった。これらの株は、流行タイプ CC92 ではなかった。ベトナムではベッドは、複数の患者が共有しているようであるし、グローブや予防衣の着用などの基本的な感染対策も十分にされていないようなので、一旦耐性菌が病棟に持ち込まれると速やかに院内に拡散し、蔓延してしまうと推測される。また、市中の薬局で処方箋なしで抗菌薬が購入出来るので、国民は比較的頻繁に抗菌薬を服用しているようである。このようなことも、耐性菌を社会で拡散させる一因であると考えられる。

#### 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。ベトナムで分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生 *A. baumannii* は、ほとんどが非流行タイプであり、様々な遺伝子型株が混在していたこのタイプは、仮に日本国内に持ち込まれても通常の感染対策がしっかりと実施されていれば、大きな院内感染を起こす可能性は低いと思われるが、日本において医療機関が海外渡航歴のある患者を受け入れる場合には注意を払う必要があると考えられる。

#### F. 健康危機情報

途上国を旅行中に現地の医療機関に入院し、帰国して国内の医療機関に入院する患者については、特に NDM 型のような外国で蔓延している耐性菌について注意を払う必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.  
Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT. *J. Clin. Microbiol.* 2013 Jan;51(1):373-4.
- 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、2012 年現在。  
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(1):8-9, 2013.

- 3) 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.

- 4) 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	

Table 2. Inhibitory activity of sodium mercaptoacetate (SMA) disks for New Delhi metallo- $\beta$ -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*