

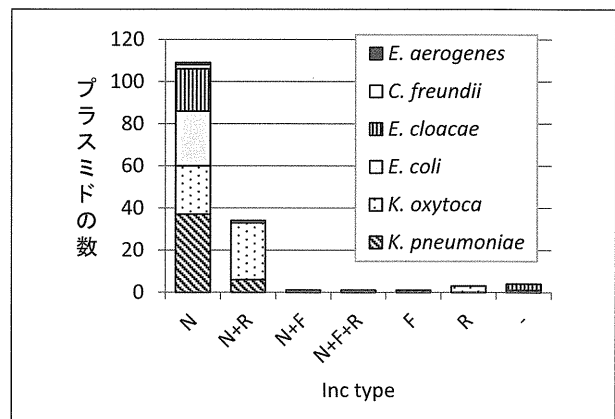
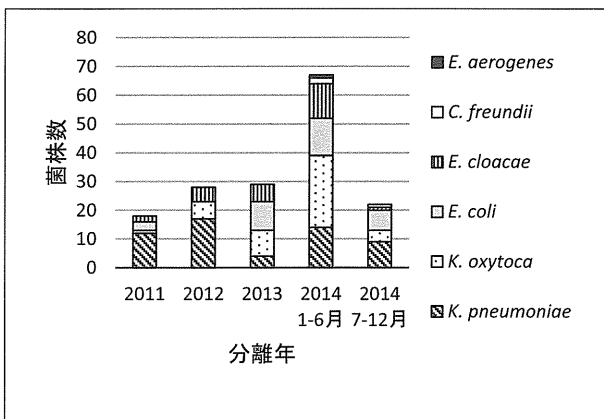
の、*E. coli*のように、互いの関連性が明確ではない株もあった。

### 3. S1-PFGEによるプラスミド解析結果

S1-PFGEによるプラスミド断片が確認できた182株由来のプラスミド解析を実施し、解析データが得られた180株由来467個のプラスミドの解析を行った。467個のプラスミドのうち、139株由来の155個のプラスミドにIMP-1型MBL遺伝子が確認され、その配列は153個のプラスミドで $bla_{IMP-6}$ 、

1個のプラスミドで $bla_{IMP-1}$ 、1個のプラスミドで $bla_{IMP-11}$ と一致した。得られたプラスミド配列をPBRT法によるInc typingで分類したところ、 $bla_{IMP-6}$ を含む153個のプラスミドのうち、144個(94%)がInc N型の配列を有したのに対し、 $bla_{IMP-6}$ を含まない314個のプラスミドのうちInc N型の配列を有したものは18個のみ(6%)であった。

$bla_{IMP-6}$ を含む137株由来153個のプラスミドのInc typingとプラスミドが分離された菌種を図2



左：図1 IMP-1型MBL遺伝子検出株(n=164)の分離年と菌種内訳

右：図2  $bla_{IMP-6}$ を含むプラスミド(n=153)のInc typingとプラスミドが分離された菌種

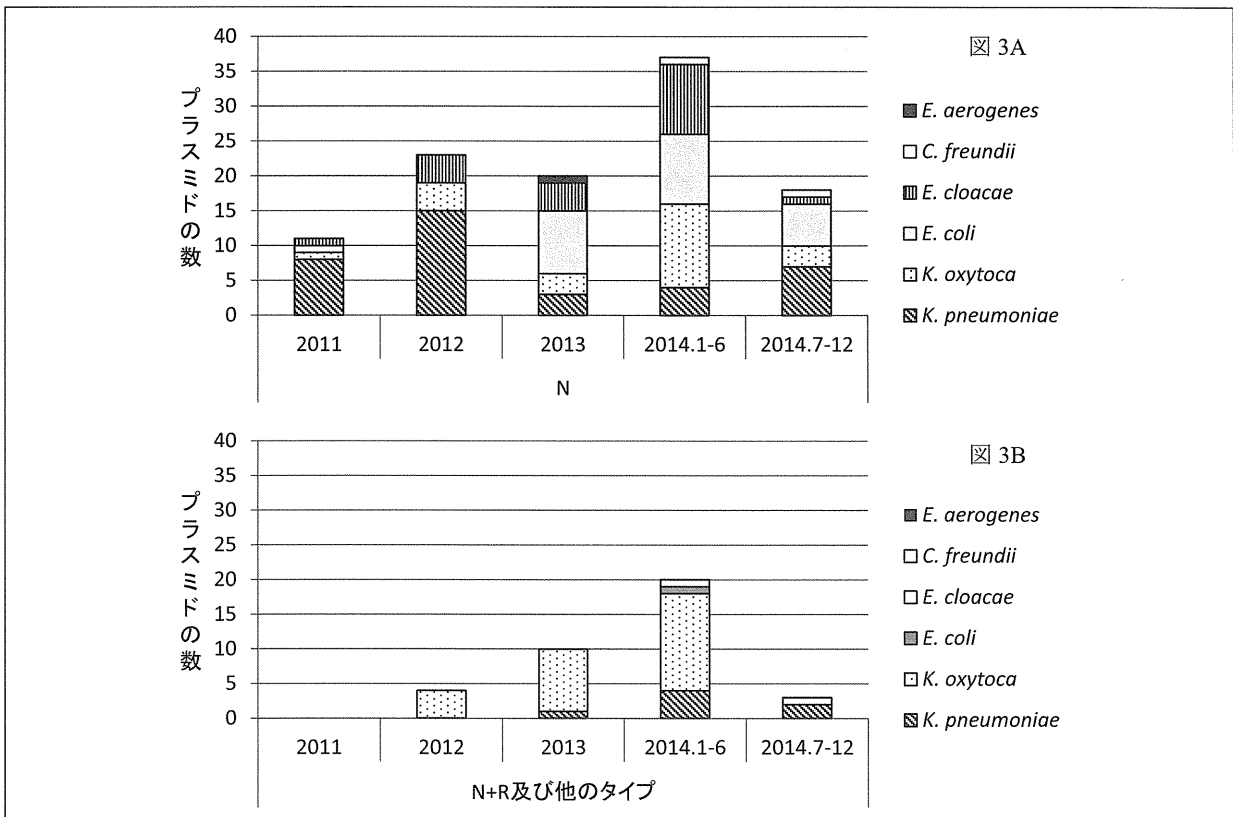


図3  $bla_{IMP-6}$ を含むプラスミドの分離年とプラスミドが分離された菌種  
[図3A; Inc N(n=109), B; Inc N+Inc R及び他のタイプ(n=44)]

に示す。Inc N型のみを有したプラスミドは109個あり、解析した6菌種全てで検出された。Inc N型とInc R型の両方が検出されたプラスミドは、34個あり、そのうち27個（80%）が*K. oxytoca*で検出された。Inc R型のみが検出されたプラスミドは3個あり、いずれも*K. oxytoca*で検出された。

*bla*<sub>IMP-6</sub>を含む137株由来153個のプラスミドのInc typingと分離年及び菌種の分布を図3に示す。Inc N型のみを有するプラスミドは2011年から検出されており、2011年、2012年は主に*K. pneumoniae*で検出されたが、2013年頃から*E. coli*、*E. cloacae*での検出が増加した。Inc N型とInc R型両方を有するプラスミドやその他のタイプは、2012年より主に*K. oxytoca*で検出されていた。

#### D. 考察

解析対象とした186株のうち、164株でIMP-1型MBL遺伝子が検出された。PFGEによるタイプング解析の結果、*K. oxytoca*、*E. cloacae*の一部、*K. pneumoniae*の一部は、同一菌株が患者間に伝播した可能性が示唆されたが、*E. coli*など互いの関連性が明らかではない株が認められた。プラスミド解析の結果、137株から分離された153個のプラスミドで*bla*<sub>IMP-6</sub>が検出され、そのうち94%がInc N型を含むプラスミドであった。本事例は、*bla*<sub>IMP-6</sub>を含むInc N型のプラスミドが関わることを示唆された。*bla*<sub>IMP-6</sub>を含むプラスミドのうち、約50kbpのInc N型の検出が最も多く、CREの分離が確認され始めた2011年から2012年に*K. pneumoniae*で検出された。Inc N型のプラスミドとInc R型のプラスミドが融合したと考えられ

るタイプは2012年頃から*K. oxytoca*を中心に分離された。本事例は*bla*<sub>IMP-6</sub>を含むInc N型のプラスミドを有する*K. pneumoniae*を発端に始まり、Inc Nプラスミドが*E. coli*や*E. cloacae*に水平伝達し、さらにInc N型とInc R型プラスミドと融合したものが*K. oxytoca*を中心に水平伝達で広がった株が患者間に伝播していったものと推察された。

#### E. 結論

*bla*<sub>IMP-6</sub>を含む約50kbpのInc N型プラスミドが、2011年より*K. pneumoniae*をはじめ菌種を超えて水平伝達し、それぞれの株が患者間に伝播した可能性が示唆された。今後、プラスミド配列をさらに詳細に比較することで、本事例の伝播状況をより明らかにできるものと期待される。また、本事例におけるCRE分離は、2014年後半には減少傾向にあり、本研究での解析結果が院内感染事例の探知の一助になった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 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

## *bla*<sub>IMP-6</sub>保有プラスミドのネットワーク解析とパンゲノム解析

研究分担者：黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長）

研究協力者：関塚 剛史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

山下 明史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

鈴木 里和（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・室長）

松井 真理（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・主任研究官）

**研究要旨** 大阪市内で、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE）による院内感染事例が発生した。本事例では、IMP-1型およびCTX-M-2グループの $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を有する多種にわたる腸内細菌科細菌が検出され、PFGEによる分子疫学的解析では同一菌株および同一クローンによる伝播の可能性が低い菌株も認められた。従来の集団院内感染事例とは異なる様式を示す本事例の特徴を明らかにするために、本事例の2011～2014年に分離されたCREの全プラスミドの配列解析を行った。網羅的全プラスミド解析の結果、*bla*<sub>IMP-6</sub>を持つ plasmid は、主に incompatibility group (Inc) N レプリコンに属するプラスミド上に存在したが、全ての Inc N プラスミドは完全に一致するものではなく、部分的な配列の変異もしくは欠失を生じていた。また、年代が進むにつれ、Inc N プラスミドと他のプラスミドとの融合プラスミドが生じていることも明らかにした。*bla*<sub>IMP-6</sub> 保有プラスミドは、Inc N プラスミドの骨格を主体とする *bla*<sub>IMP-6</sub> 保有プラスミドの塩基置換、挿入欠失、他の Inc 型との融合もしくは相同組換え、*bla*<sub>IMP-6</sub> を含む近傍領域の水平伝播、および、種・属を跨いだ広範なプラスミドの水平伝達が生じていたことが示唆された。2006年に広島で *bla*<sub>IMP-6</sub> および *bla*<sub>CTX-M-2</sub> 保有 Inc N プラスミドが分離されており、本事例で得られたプラスミドと非常に類似していたが、完全に一致はしていなかった。2006年には国内に上記プラスミドは存在し、変異の蓄積が始まっており、本事例の4年間で大きな変化を生じていたと推測され、少なくとも2011年以前からCREの脅威に晒されていた可能性が示唆された。

### A. 研究目的

大阪市内で、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE）による院内感染事例が発生した。少なくとも、2011年度から年間30～40人、計約110人がCREの保菌・感染をしていた。本事例では、IMP-1型およびCTX-M-2グループの $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を有する多種にわたるCREが検出された。PFGEによる分子疫学的解析では *Klebsiella oxytoca*、*K. pneumoniae*、および *Enterobacter cloacae* 等で、同一菌株および同一クローンによる伝播の可能性が認められた株も一部存在してい

たが、*Escherichia coli* では、その可能性は低かった。よって、染色体を中心とした解析では、全貌を把握することは困難であった。一般的に、薬剤耐性遺伝子は主にプラスミド上に存在し、水平伝達によって拡散することが知られていることから、本事例の特徴を把握するにはプラスミドの比較解析を行うことが最も適切と判断された。よって、従来の集団院内感染事例とは異なる様式を示す本事例の全貌を把握し、その特徴を明らかにするために、本事例の2011～2014年に分離されたCREを含む腸内細菌科および2010～2014年に分離された本事例以外のCREの全プラスミドの配

列解析を行い、網羅的比較解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

本事例の2011～2014年に分離されたCREを含む腸内細菌科および2010～2014年に分離された本事例以外のCRE、合計227株を使用した。

### 2. S1-PFGEによるプラスミドの分離精製

アガロースに封入した細菌を溶菌後、S1 nuclease処理を行い、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)にてプラスミド断片を分離し、認められた全ての断片を回収し、DNAを抽出した(担当：細菌第二部)。

### 3. プラスミド断片の配列解読

得られたS1処理プラスミド断片のDNAライブラリーは、Nextera XT ライブラリーキット (Illumina) を用いて作成した。その後、MiSeq (Illumina)にてDNAライブラリーを300×300merのpaired-end解読を行った(担当：病原体ゲノム解析研究センター)。

### 4. プラスミド配列解析

得られたMiSeq解読リードは、A5 MiSeqもしくはA5 assemblerを用いて*de novo* assembleを行った。得られたcontigからprogidalを用いてORF抽出を行った。PBRT Inc typingおよび薬剤耐性遺伝子の確認は、BLASTNおよびTBLASTNにてそれぞれ行った(担当：病原体ゲノム解析研究センター)。

### 5. プラスミド比較解析

S1処理プラスミド断片と得られたtotal contig sizeの比率が $< \times 0.5$ および $> \times 1.5$ のものは、解析から除外した。プラスミドネットワーク解析は、抽出されたORFのアミノ酸配列が100%のidentityを示し、30 ORF以上共通する場合に各プラスミドを連結しネットワーク化した。ネットワークの図示には、Cytoscapeを使用した。プラスミドpan-genome解析では、PGAPを用いて、*bla*<sub>IMP-6</sub>を含むプラスミドのみを使用し、各ORFのアミノ酸配列が100%のidentity、且つ、各ORF長のカバー率が80%以上の場合に、ORFsをクラスタリングして分類した。Heatmapの作成にはRを用いて行った。

(倫理面への配慮)

微生物検査として分離菌株の配列解析を行っており、患者特定可能な情報は一切取り扱っていない。

## C. 研究結果

### 1. プラスミド分布状況

S1-PFGEを行った結果、227株の菌株から、612個のプラスミドを検出した。全てのプラスミドの解析を行い、S1 nuclease処理プラスミド断片長と得られたtotal contig sizeの比率が0.5以上および1.5以下に収まったものは、224株から563個のプラスミドに絞られた。S1 nuclease処理プラスミド断片長より長いtotal contig sizeが得られたものは、ほぼS1 nuclease処理プラスミド断片長の2倍のtotal contig sizeとなっており、同一サイズのplasmidが2種類存在していた。

563個のプラスミドの内、カルバペネム耐性に関わる*bla*<sub>IMP-6</sub>を保有するプラスミドは、167株中に186個存在していた(図1)。得られたプラスミドをPBRTのInc typingで分類したところ、Inc N型が検出されたものは177個であり、全体の約95%がInc N型に関連していた。特に、Inc Nのみが検出されたプラスミドは、131個存在し、*Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*および*K. pneumoniae*それぞれで高い割合を示した(図1)。年代別に分類すると、2011および2012年で*K. pneumoniae*のInc N型の検出が他のplasmidより多く検出されていた(図2)。2013年には、*E. coli*のInc N型および*K. oxytoca*のInc N, R融合型が多く検出された(図2)。2014年になると、*E. cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*および*K. pneumoniae*のInc N型および*K. oxytoca*のInc N, R融合型が多く検出され、Inc N, R融合型は*E. coli*, および*K. pneumoniae*からも検出されてきた。また、Inc Nとその他Inc型の融合プラスミドが検出された(図2)。

### 2. プラスミドネットワーク解析

563個のプラスミドを用いてネットワーク解析を行ったところ、427個のプラスミドで構成された大きなクラスター (largest connected component (LCC)) が構成された(図3)。Inc型でプロット

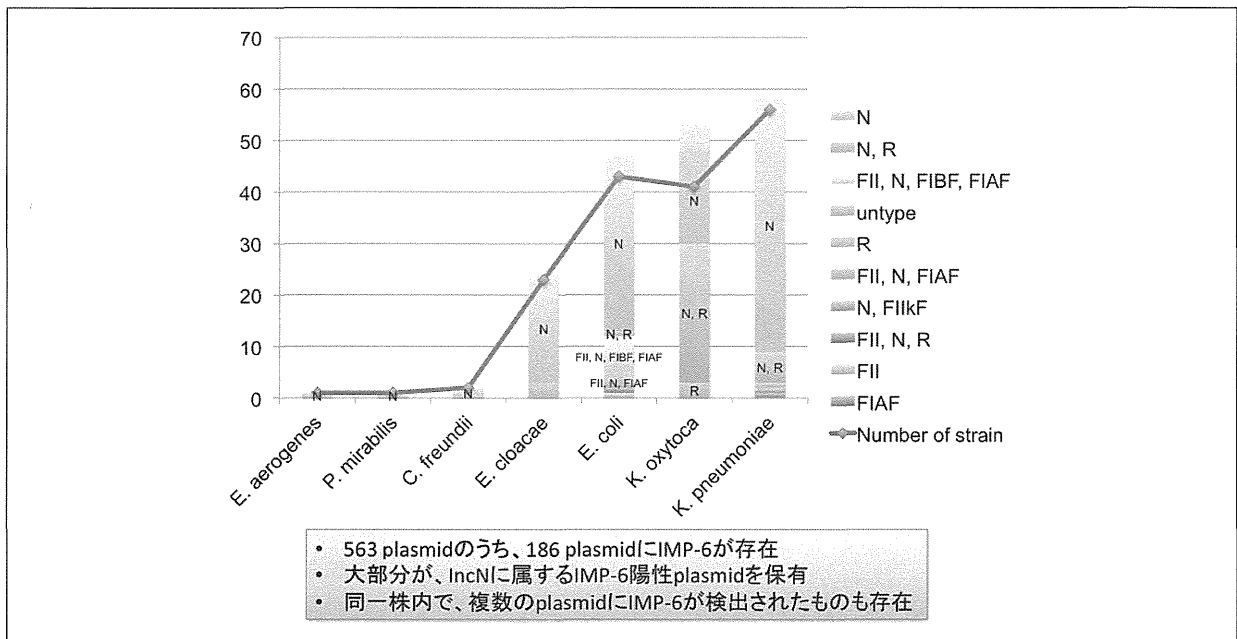


図1 本事例分離菌株および $bla_{IMP-6}$ 保有プラスミドInc typeの概要

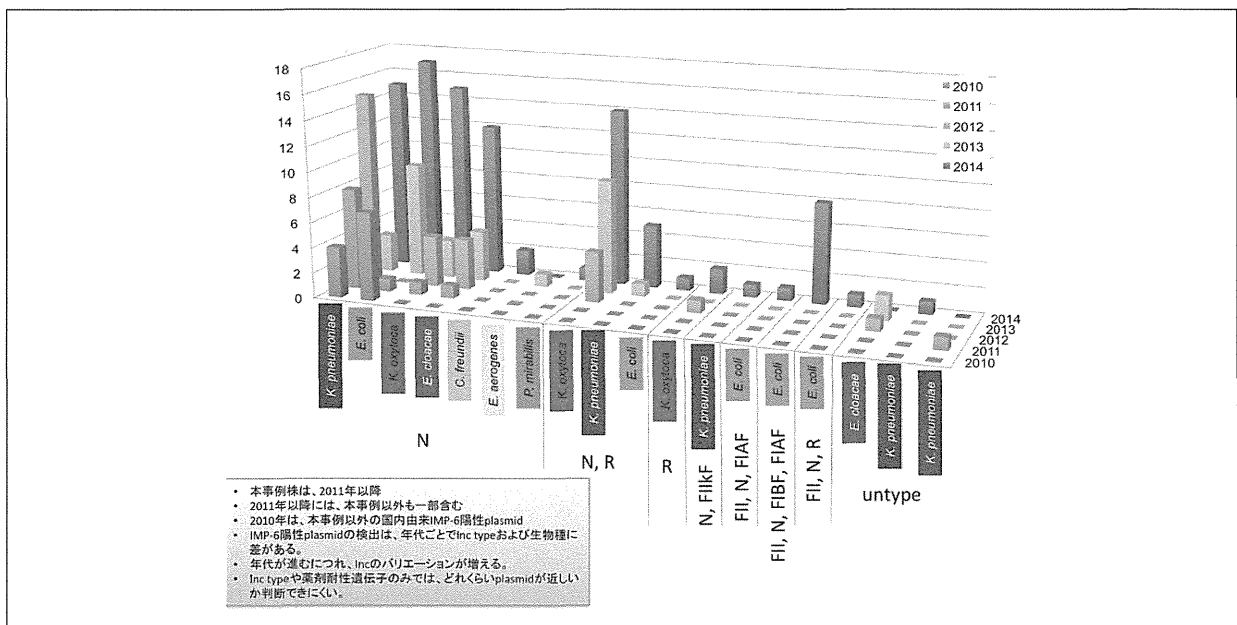


図2 年代別分離菌株および $bla_{IMP-6}$ 保有プラスミドInc typeの概要

すると、LCCの中心にInc N型、Inc N, R融合型およびInc FII, N, FIBF, FIAF融合型が近縁な関係として分布していた。LCC内の中心クラスターから派生するクラスターは、それぞれのInc型でまとまる傾向を示していた(図3)。ネットワークを生物種で分類すると、LCCの中心クラスターには多種にわたる生物種がプロットされるが、その他のクラスターには種もしくは属ごとでまとまっていた(図4)。さらに、 $\beta$ ラクタマーゼ $bla_{IMP-6}$ および $bla_{CTX-M-2}$ の保有の分布をプロットすると、

中心クラスターに分布するInc N型、Inc N, R融合型で $bla_{IMP-6}$ および $bla_{CTX-M-2}$ が存在していた(図5)。一方、*E. coli* Inc FII, N, FIBF, FIAF融合型、*K. oxytoca* Inc R型および*E. cloacae* Inc untype不明型では、 $bla_{CTX-M-2}$ が欠失しているものが検出された(図5)。Inc Nの融合型プラスミドは、それぞれの菌種内で保有する特徴的なプラスミドと融合している傾向を示した。

### 3. プラスミドpan-genome解析

ネットワーク解析では、それぞれのプラスミド

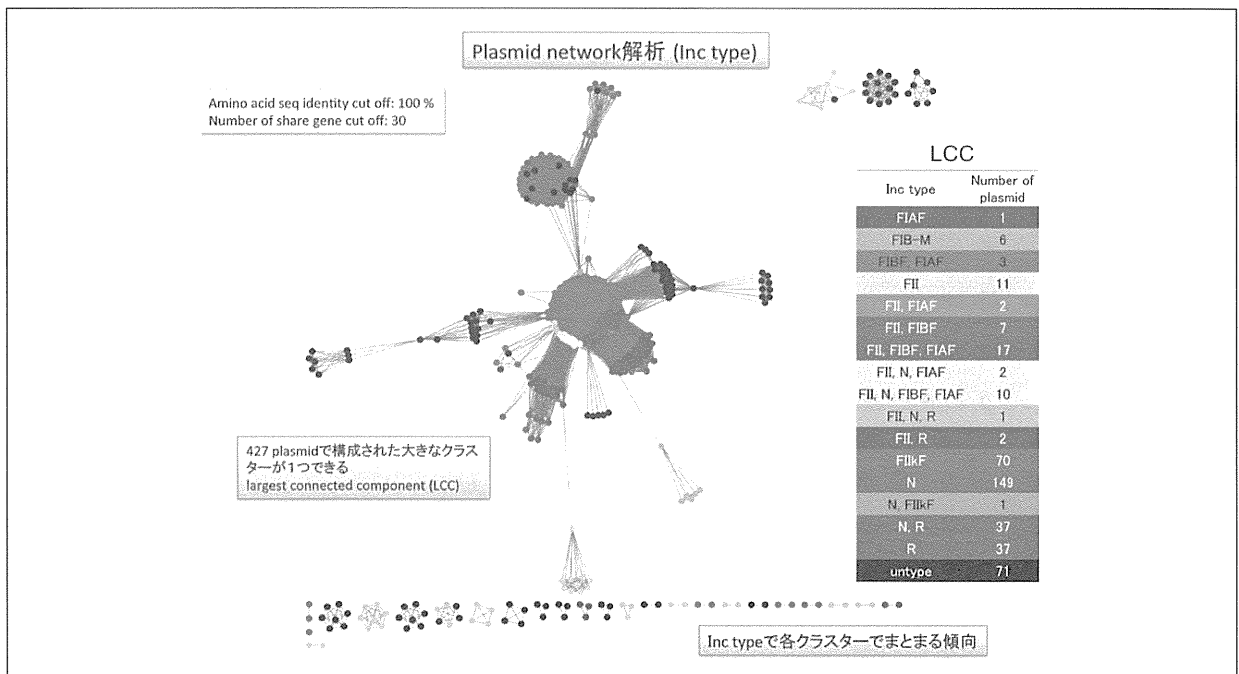


図3 プラスミドネットワーク解析PBRT Inc typeでアノテーションした結果

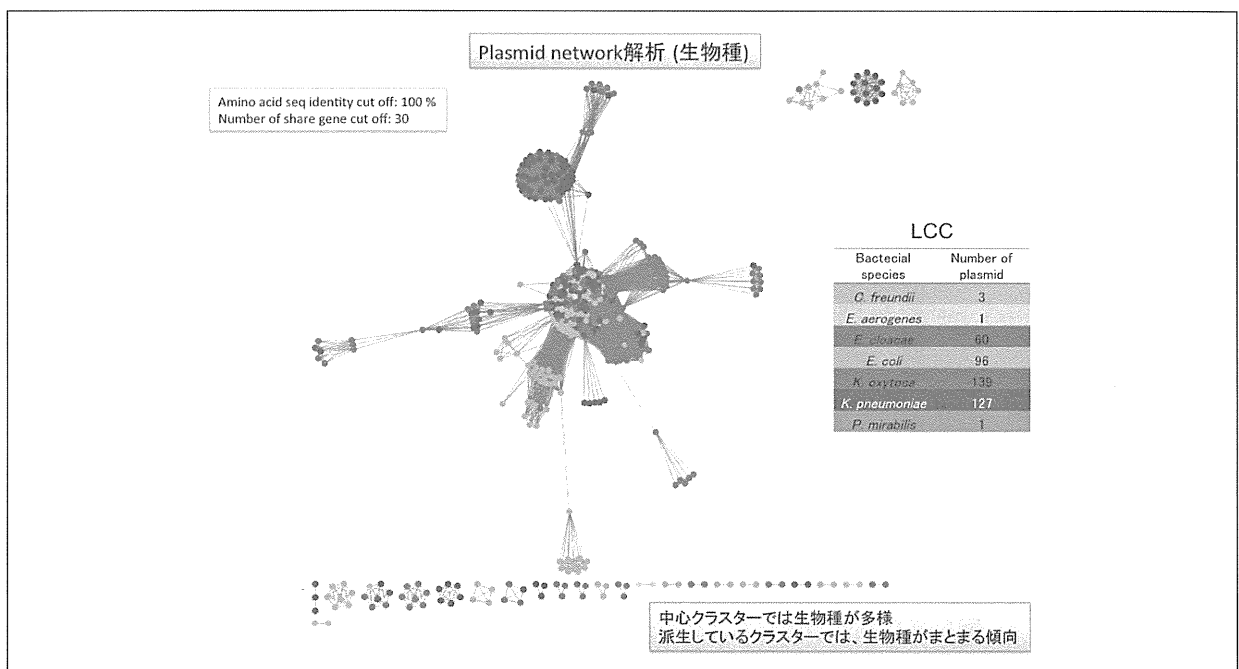


図4 プラスミドネットワーク解析 生物種でアノテーションした結果

の繋がりは把握できるが、詳細が不明であるため、*bla*<sub>IMP-6</sub> 保有プラスミド (n=186) のみを用いた pan-genome 解析による詳細な検討を行った (図 6)。その結果、100% の identity を持つ ORF は、合計 2,713 個にクラスタリングされ、各生物種の Inc 型の骨格にまとまった。Inc N backbone プラスミドは、全プラスミドが完全に保存されておらず、一部アミノ酸置換もしくは欠失を生じていた。

特に、2006年に広島で初めて分離された *bla*<sub>IMP-6</sub> および *bla*<sub>CTX-M-2</sub> 保有 Inc N 型プラスミドは、本事例の Inc N 型プラスミドと高い類似性は示すものの、100% の相同性を有する ORF の保有数は本事例間のものに比べて低かった。融合型のプラスミドは、それぞれの生物種が持つ特徴的な別の Inc 型プラスミド骨格と融合することで *bla*<sub>IMP-6</sub> を獲得し、さらに他のプラスミド骨格間でも融合ある

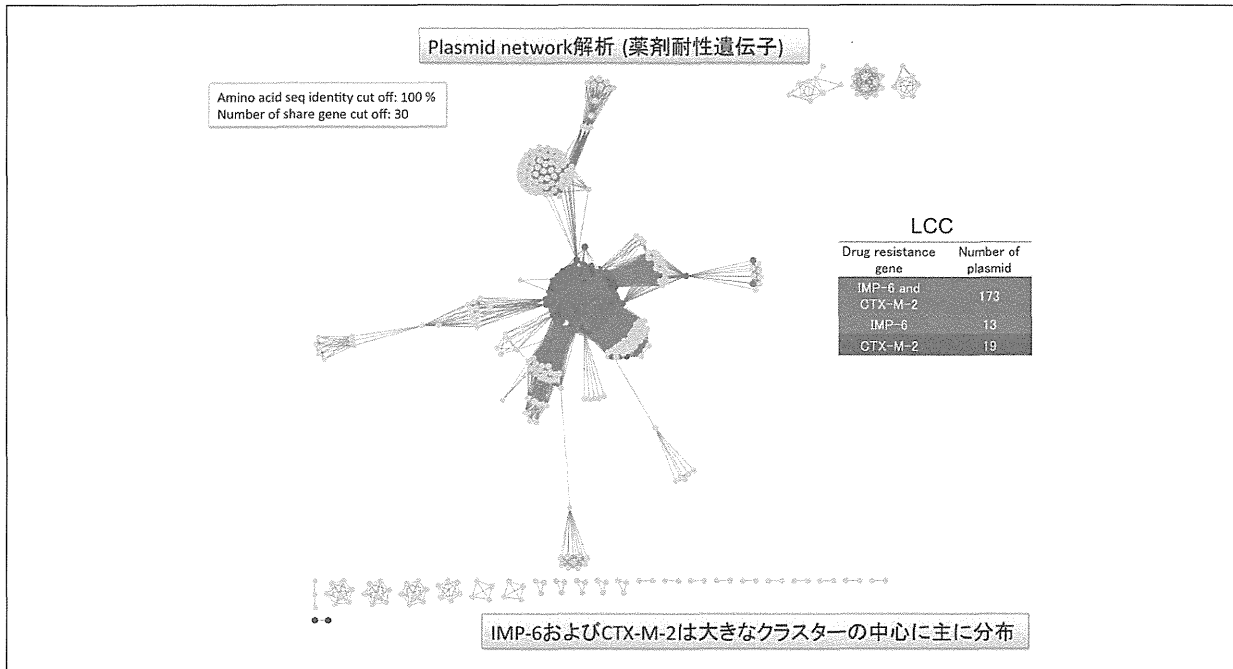


図5 プラスミドネットワーク解析 薬剤耐性遺伝子でアノテーションした結果

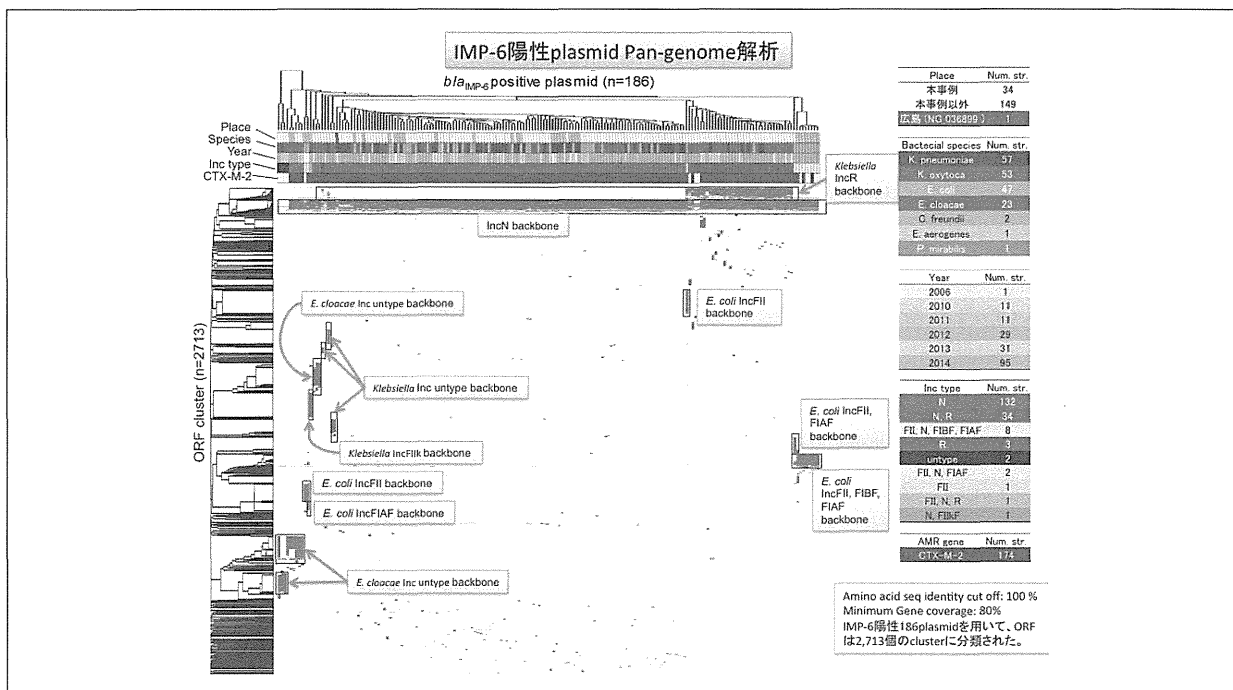


図6 *bla*<sub>IMP-6</sub> 保有プラスミド pan-genome 解析結果

いは組換えを生じている傾向を示した。2株の *E. coli* では、主に *Klebsiella* 属が保有する Inc R backbone をもつ融合型プラスミドが検出され、1株の *K. pneumoniae* では、*E. cloacae* Inc untype backbone をもつプラスミドが検出された。3株の *E. cloacae*、および1株の *K. pneumoniae* の *E. cloacae* Inc untype backbone をもつプラスミドでは、Inc N backbone をほとんど持ち合わせて

おらず、*bla*<sub>IMP-6</sub> およびその近傍に存在する ORF のみを保有していた。

#### D. 考察

プラスミド解析の結果、*bla*<sub>IMP-6</sub> を保有するプラスミドは、167株中に186個存在し、得られたプラスミドの内、Inc N型が検出されたものは177個であり、全体の約95%がInc N型に関連してい

た。このことから、本事例は、主に *bla*<sub>IMP-6</sub> 保有 Inc N 型プラスミドの水平伝達を介した CRE による院内感染事例であることが強く示唆された。2011～2012 年では、*K. pneumoniae* の *bla*<sub>IMP-6</sub> 保有 Inc N 型プラスミドの検出が多かったことから、本事例の起点は、*K. pneumoniae* であることが示唆される。2013 年には、*E. coli* の Inc N 型および *K. oxytoca* の Inc N, R 融合型が多く検出されており、CRE の種類が変化して院内感染が拡大したことが示唆される。さらに、2014 年では多種類の CRE が複数検出され、Inc 融合型のプラスミドも複数検出された。これらの結果から、2013～2014 年にかけて、プラスミドの大規模な変化が生じたことが示唆され、これにより疫学および細菌学的解析での混乱を招いたことが予測される。

プラスミドネットワーク解析の結果、*bla*<sub>IMP-6</sub> および *bla*<sub>CTX-M-2</sub> を保有する Inc N 型プラスミドを骨格に持つものは、その他の生物種に特有の Inc 型プラスミドと大きなクラスターを形成していた。Inc N 型プラスミドの水平伝達後に、各生物種特有の Inc 型プラスミドとの融合もしくは相同組換えなどの変化が生じたことが示唆される。

*bla*<sub>IMP-6</sub> 保有プラスミドの pan-genome 解析の結果、Inc 型に沿った骨格を持つ ORF でクラスタリングされた。本事例の Inc N backbone プラスミドは、2011～2014 年の間で完全に保存されてはおらず、短期間に多種にわたる腸内細菌科に水平伝達された可能性は低い。2006 年に広島で初めて分離された *bla*<sub>IMP-6</sub> および *bla*<sub>CTX-M-2</sub> 保有 Inc N 型プラスミドとも 100% の相同性を有する ORF 数は低かった。このことから、2006 年に発見された時点から既に変異の蓄積が始まっていたと推測され、また、本事例では 2011 年以前から *bla*<sub>CTX-M-2</sub>

保有プラスミドを持つ CRE に晒されていた可能性もある。さらに、本事例が発生した 4 年間に於いて、Inc N backbone を主体とする *bla*<sub>IMP-6</sub> 保有プラスミドの塩基置換、挿入欠失、他の Inc 型との融合もしくは相同組換え、*bla*<sub>IMP-6</sub> を含む近傍領域の水平伝播、および、種・属を跨いだプラスミドの水平伝達が生じてきたことが示唆された。

## E. 結論

CRE の大規模プラスミド解析を行ったことで、*bla*<sub>IMP-6</sub> 保有 Inc N プラスミドの変化が想像以上に進んでいたことが明らかとなった。本事例の起点が、どの菌株により発生したかを断定することは困難であったが、少なくとも 2011 年以前から CRE の脅威に晒されていた可能性がある。また、比較的保存性が高い染色体上の配列とは異なり、プラスミドは多様な形態変化を短期間で生じていることが示唆された。より詳細なプラスミドの変化を追跡するには、本事例の特徴的な代表プラスミド配列の完全長配列を決定し、より詳細な比較解析および系統解析を行う必要があると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 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



## 関西地区の中核病院周辺医療機関より分離された カルバペネム耐性腸内細菌科細菌のプラスミド解析

研究分担者：鈴木 里和（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・室長）

研究協力者：柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

松井 真理（国立感染症研究所・細菌第二部第一室・主任研究官）

黒田 誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長）

関塚 剛史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

山下 明史（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

**研究要旨** 関西地区の中核病院（O病院）において2012年頃より持続していたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）の院内感染事例では、ほとんどの菌株がincompatibility group N (inc N) に属し *bla*<sub>IMP-6</sub> を持つプラスミドを保有していた。周辺医療機関においてこのプラスミドの拡散が懸念されたため、周辺医療機関より分離されたCREのプラスミド解析を実施した。

周辺の9医療機関で分離された28株由来29プラスミドの解析を実施した。29プラスミドのうち、関西地区の中核病院（O病院）分離株と同じ *bla*<sub>IMP-6</sub> を保有するプラスミドが22個（76%）、異なる型である *bla*<sub>IMP-1</sub> を保有するプラスミドも7個（24%）分離されていた。

*bla*<sub>IMP-6</sub> を保有するプラスミドのうち、10個が、関西地区の中核病院（O病院）分離株の多くが保有していた約50kbpのInc Nプラスミドだった。しかし、このタイプのプラスミドは疫学関連が無くてもきわめて類似した塩基配列を有する可能性が高く、かつ2010年頃にはすでに近畿地方を中心に拡散していたと考えられたため、その由来を追跡することは困難であった。そのほかにも、同じincompatibility group に属する類似したプラスミドが複数の医療機関より分離されていたが、いずれもO病院分離株由来と特定可能な配列の一致は認められなかった。疫学調査に活用可能となるプラスミド解析の手法については今後も更なる検討が必要と思われた。

### A. 研究目的

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE）は公衆衛生上の脅威として、世界中でその拡散が警戒されている。2014年3月、関西地区の中核病院（O病院）で2年以上の長期にわたってCRE大規模な院内感染事例が存在したことが明らかとなった。症例数が100例を超え、国内で類を見ない大規模な事例であった。長期にわたって院内感染が持続してしまっただけの要因のひとつとして、CREとして分離された菌種が、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*、*Escherichia coli*、*Enterobacter cloacae*などと複数にわたっていたことがあげられる。それに加え、これらの菌株にカルバペネム

耐性を付与していたのがIMP-6メタロ-β-ラクタマーゼ（metallo-β-lactamase: MBL）であり、メロペネムには耐性を示すが、イミペネムには感性となる特徴的な型であった。さらに、関西地区の中核病院（O病院）分離株の分子疫学解析により、分離株の多くがincompatibility group N (Inc N) に属し *bla*<sub>IMP-6</sub> と *bla*<sub>CTX-M-2</sub> を持つプラスミドを共有していたことが明らかとなり、プラスミドの水平伝達が事例の拡大に関連していたことが示唆された。

2014年に事例が明らかとなった時点では、すでに多くの症例が退院しており、中には市内の関連病院への転院例もあったため、このプラスミドを保有するCREが周辺医療機関に拡散しているこ

とが懸念された。そこで、周辺医療機関より分離されたCREのプラスミド解析を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 解析菌株

2014年3月以降、大阪市内の医療機関で分離され、大阪市保健所を通じて国立感染症研究所に行政検査が依頼された菌株を対象とした。また、大阪市外ではあるが、大阪府内の医療機関において複数のCREが分離されたため、それらの株も解析に追加した。

### 2. 解析方法

①PCR法による薬剤耐性遺伝子の検出: IMP-1型MBL遺伝子をPCR法で検出し、陽性となった株のみプラスミド解析を実施した。

②プラスミド塩基配列の解読: アガロースゲルに包埋したDNAを、S1 nucleaseで処理し、パルスフィールド電気泳動(PFGE)にてプラスミドDNAのバンドを分離した。確認できた全てのプラスミドDNAバンドを回収、DNAを抽出し、MiSeq (Illumina)にてpaired-end解読を行った。

③プラスミド配列解析: 得られたMiSeq解読リードは、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターが開発した(Global Plasmidome Analyzing Tool, GPAT) および(inter-Plasmid Analyzing Tool, iPAT)を用いて解析を行った。GPATでは、A5 MiSeqもしくはA5 assemblerを用いた*de novo* assembleにより得られたcontigからprogitalを用いたORF抽出を行っている。また、PCR-based replicon typing (PBRT) 法によるIncompatibility typing (Inc type) 及び薬剤耐性遺伝子の確認は、BLASTNおよびTBLASTNにてそれぞれ行っている。

またiPATでは、GPATで解析を行ったプラスミドのうち、ネットワーク解析を行うプラスミドを選択し、相互の類似性を比較した。Whole Similarity解析では塩基ベースでの共有しあう割合を比較した。自身の持っている配列のうち相手が持っている配列の割合と、相手の持っている配列のうち自身が持っている配列の割合の和をもって、それぞれのプラスミドの類似スコアとした。また、類似スコアをフルスコアで除したものを類似割合とした(図1) 同じ配列の二つのプラスミ

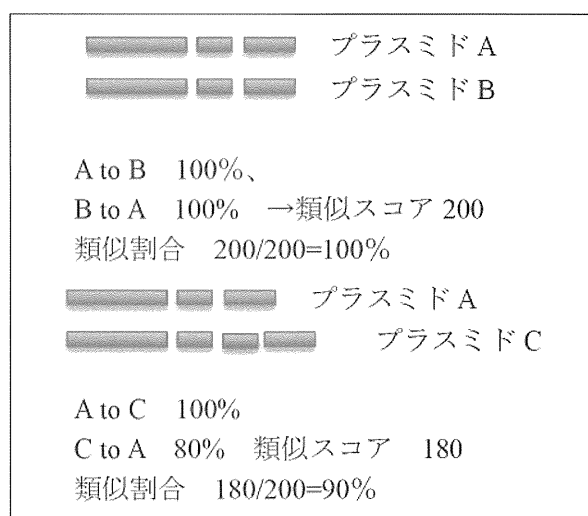


図1

ドを比較した場合、お互いの配列の共有割合はいずれも100%となるため、その和は200となる。一方、片方のプラスミドがもう一方のプラスミドに他の配列が挿入されていた場合、100%と90%となり、類似スコア189となる。

また、Gene network解析では、プラスミド上の遺伝子がコードするアミノ酸配列が100%一致するORFを、プラスミド間で共有する個数を変化させていくことにより、プラスミド間の類似性を評価した。

④分離菌株の疫学情報収集: 医療機関Fからは、12株が送付され、事前の解析で、IMP-6型MBL産生菌の可能性が高かったことから、F病院を訪問し、大阪市保健所の協力を得て、分離された患者の臨床情報を医療記録より収集した。

(倫理面への配慮)

菌株が分離された患者については個人が特定できる情報は本研究では扱わない。ただし、医療機関Fでの疫学情報収集時には医療記録を閲覧したため、個人情報を確認する必要があったが、研究用の記録には個人情報を記載せず、医療機関から個人情報の持ち出しは行わなかった。また、すでに事例が公表されているO病院以外の医療機関名については本研究報告書では記載しないこととした。

## C. 研究結果

### 1. PCR法による薬剤耐性遺伝子の検出

送付されたA～Lの12医療機関由来45株のう

ち、PCRで $bla_{IMP}$ が検出されたのは、医療機関 C, H, Iを除く9医療機関の30株(67%)であった。このうち2株はS1 nuclease後のPFGEでスメアとなりプラスミドDNAバンドが得られなかった。プラスミド解析を行ったのは、*K. pneumoniae* 12株、*E. coli* 10株、*E. cloacae* 5株、*Proteus mirabilis* 1株の28株であった。

## 2. プラスミド解析結果

表1に得られたプラスミドのGPATによる解

析結果を示す。30プラスミドの解読を行ったが、そのうち、D病院の*E. cloacae*(感染研菌株No. 14-469)およびF病院の*E. coli*(感染研菌株No. 14-608)のプラスミドバンドは切り出しサイズと解読サイズとが大幅に異なっていたため、解析より除外した。最終的に解析対象とした29個のプラスミドをIMPのシーケンス型、Inc type、切り出しサイズと解読サイズより推定したおおよそのプラスミドサイズごとに分類をした結果を表2に

表1 プラスミド解析実施株、分離医療機関、IMPシーケンス型、およびGPATによるIncompatibility typingと解読サイズ

医療機関	菌種/感染研菌株 No.	IMP型	$bla_{IMP}$ 保有プラスミド Inc type / 切り出しサイズ (kbp)	解読サイズ (bp)
A	<i>K. pneumoniae</i> /14-289	1	N/80	79,249
	<i>K. pneumoniae</i> /14-290	1	N/50	55,548
B	<i>K. pneumoniae</i> /14-349	6	N/45	51,372
	<i>K. pneumoniae</i> /14-460	6	N, FIIkF/180	185,422
	<i>K. pneumoniae</i> /14-461	6	N/50	51,786
D	<i>E. coli</i> /14-468	6	N/50	65,100
	<i>E. cloacae</i> /14-469	6	FII, N, FIBF, FIAF/175 N/120	169,283 123,885
	<i>E. coli</i> /14-494	6	N/245 FII, N, FIBF, FIAF/ 195 FII/150	123,453 199,519 145,141
E	<i>K. pneumoniae</i> /14-495	6	N/50	52,339
	<i>K. pneumoniae</i> /14-496	6	N/50	52,814
	<i>K. pneumoniae</i> /14-497	6	N/50	53,799
F	<i>P. mirabilis</i> /14-499	6	N/50	50,817
G	<i>K. pneumoniae</i> /14-502a	6	N/50	52,749
	<i>K. pneumoniae</i> /14-502b	6	N/50	52,540
J	<i>E. cloacae</i> /14-531	1	HI2/260	254,398
K	<i>K. pneumoniae</i> /14-567	6	N/50	52,767
F	<i>E. coli</i> /14-599	6	FII, N, FIBF, FIAF/120	114,088
	<i>E. coli</i> /14-600	6	FII, N, FIBF, FIAF/120	114,176
	<i>E. coli</i> /14-601	6	FII, N, FIBF, FIAF/120	113,906
	<i>E. coli</i> /14-602	6	FII, N, FIBF, FIAF/120	114,285
	<i>E. coli</i> /14-603	6	FII, N, FIBF, FIAF/120	114,285
	<i>E. coli</i> /14-604	6	FII, N, FIBF, FIAF/120	114,283
	<i>E. coli</i> /14-605	6	FII, N, FIBF, FIAF/120	114,423
	<i>K. pneumoniae</i> /14-606	1	HI2/300	291,458
	<i>E. cloacae</i> /14-607	1	HI2/300	282,115
	<i>E. coli</i> /14-608	6	<u>FII, N/40</u>	<u>96,955</u>
	<i>E. cloacae</i> /14-609	1	HI2/300	267,941
<i>E. cloacae</i> /14-610	1	-/120	122,247	

示す。

解析した29個のプラスミドのうち、*bla*<sub>IMP-6</sub>を保有する約50kbpのInc Nタイプのプラスミド (IMP-6/Inc N/50kb) が10個 (34%) を占め、周辺6医療機関から分離された株由来であった。なお、このタイプのプラスミドはO病院の多くの菌株が保有していた。ついで分離数が多かったのは、FII、N、FIBF、FIAFの複数のInc typeが融合している120-180kbpのサイズの、*bla*<sub>IMP-6</sub>を保有するプラスミドであった。このタイプの9個プラスミドのうち7個は同じ医療機関Fの患者より分

離された*E. coli*由来であったが、そのほかにも異なる2つの医療機関からも分離されており、O病院分離株のなかにも1株含まれていた。さらに、*bla*<sub>IMP-1</sub>を保有する250kbp-300kbpのInc HI2に属するプラスミドも二つの異なる医療機関分離株由来であった。

IMP-6/Inc N/50kbタイプのプラスミド10個をiPATを用いたWhole Similarity解析を行った。表3に示すように、プラスミドサイズが最も大きい*E. coli*由来のプラスミドを除き、いずれも相互に95%~100%の塩基配列を共有しており、こ

表2 *bla*<sub>IMP</sub>のシーケンス型とInc type別プラスミド数

IMP sequence type	Inc type	Plasmid size (Approximate)	解析プラスミド数	菌種 (プラスミド数)	医療機関 (プラスミド数)
6	N	50	10	<i>K. pneumoniae</i> (8) <i>E. coli</i> (1) <i>P. mirabilis</i> (1)	B (2),D(1),E(3),F(1),G(2)*,K(1)
	FII, N, FIBF, FIAF	120-180	9	<i>E. coli</i> (9)	D(1),E(1),F(7)
	N	120	1	<i>E. cloacae</i> (1)	D(1)
	N,FIIkF	180	1	<i>K. pneumoniae</i> (1)	B(1)
	FII	150	1	<i>E. coli</i> (1)	E(1)
1	N	50-80	2	<i>K. pneumoniae</i> (2)	A(2)
	HI2	250-300	4	<i>E. cloacae</i> (3) <i>K. pneumoniae</i> (1)	J(1), F(3)
	-	120	1	<i>E. cloacae</i> (1)	F(1)

表3 O病院周辺医療機関分離株由来のIMP-6/Inc N/50kbタイププラスミドのWhole Similarity解析

*	# 329	Pla-516	Pla-511	Pla-509	Pla-519	Pla-507	Pla-556	Pla-766	Pla-774	Pla-898
# 329	100	100	100	100	100	100	100	96	98	99
Pla-516	100	100	100	100	100	100	100	96	98	99
Pla-511	97	97	100	97	97	97	97	94	96	97
Pla-509	100	100	100	100	100	100	100	96	98	99
Pla-519	100	100	100	100	100	100	100	96	98	99
Pla-507	100	100	100	100	100	100	100	96	98	99
Pla-556	100	100	100	100	100	100	100	96	98	99
Pla-766	100	100	100	100	100	100	100	100	98	99
Pla-774	100	100	100	100	100	100	100	96	100	99
Pla-898	87	87	87	87	87	87	87	84	85	100

#329,B病院分離 *K. pneumoniae*/MRY14-349 由来  
Pla-516,G病院分離, *K. pneumoniae*/ MRY 14-502 b  
Pla-511,E病院分離, *K. pneumoniae*/ MRY 14-497  
Pla-509,E病院分離, *K. pneumoniae*/ MRY 14-496  
Pla-519,G病院分離, *K. pneumoniae*/ MRY 14-502a  
Pla-507,E病院分離, *K. pneumoniae*/ MRY 14-495  
Pla-556,B病院分離, *K. pneumoniae*/ MRY 14-461  
Pla-766,F病院分離, *P. mirabilis*/ MRY 14-499  
Pla-774,K病院分離, *K. pneumoniae*/ MRY 14-567  
Pla-898,D病院分離, *E. coli*/ MRY 14-468

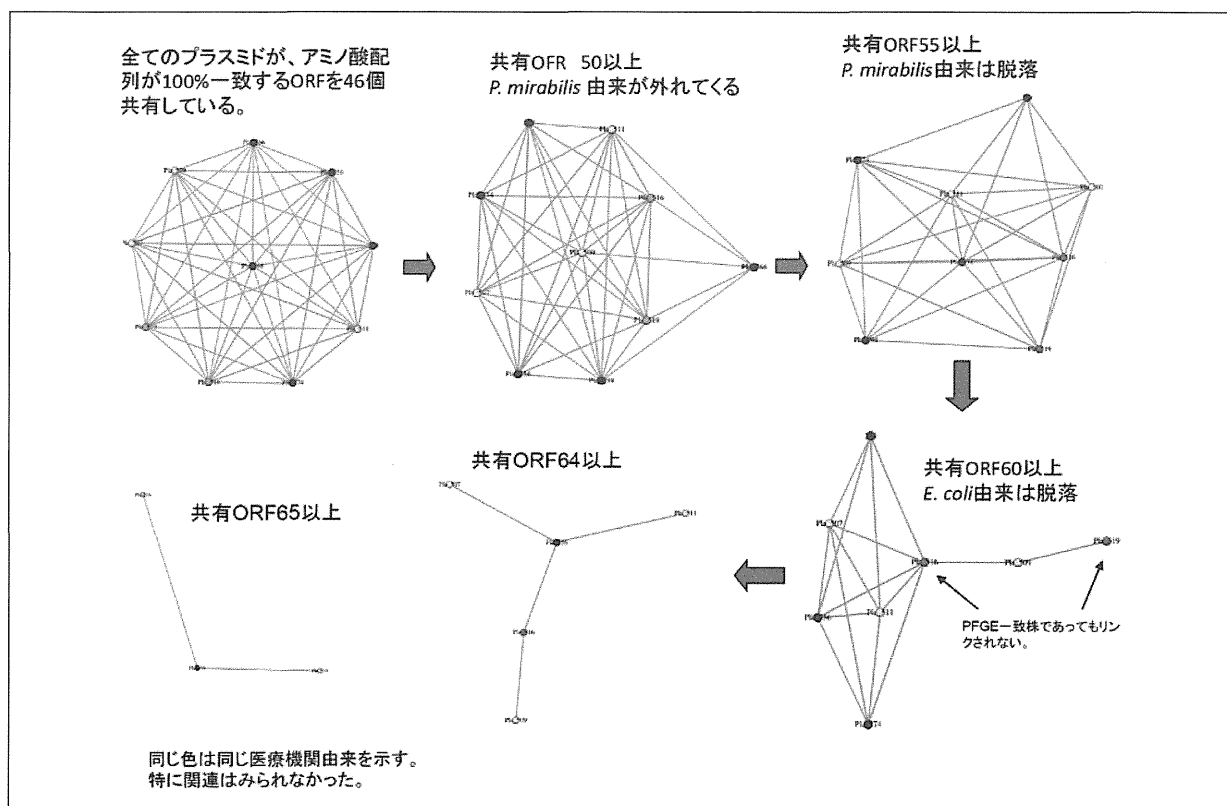


図2 O病院周辺医療機関分離株由来のIMP-6/Inc N/50kb タイププラスミドの Gene network 解析

れらは極めて配列の類似しているプラスミドであった。また、iPATを用いたGene network解析の結果を図2に示す。10個のプラスミドはすべて46個の共通するORFを保有していた。しかし共通するORF 50個以上での連結線 (edge) 図2ではF病院分離の *P. mirabilis* 由来のプラスミドが外れ、ORF 60個以上にするとさらにD病院分離の *E. coli* が群より外れる。 *K. pneumoniae* 由来のプラスミドは由来株の分離医療機関と、共通するORF数との間に関連は見られなかった。

IMP-6/IncFII, N, FIBF, FIAF/120-180kbpタイプのプラスミドはいずれも *E. coli* 由来であった。そのうちF病院入院患者より分離された *E. coli* が7株を占め、これらの *E. coli* の *Xba*Iを用いたPFGE解析のバンドパターンは100%一致していた。またこれらの株に由来するプラスミドはいずれも解読サイズが約114kbpであり、iPATのWhole Similarity解析においても、すべての組み合わせで99%~100%の塩基配列を共有していた。一方、異なる医療機関からの分離株に由来するプラスミドは解読サイズが180kbp前後と大きく、医療機関F分離株由来のプラスミドと共有す

る塩基配列の割合は70-80%と低かった。

医療機関Fの *E. coli* 分離患者7名については過去数年にわたっての医療機関受診歴も含めた詳細な調査を行ったが、O病院受診歴のある患者はいなかった。また、長期入院中の1名を除く6名はいずれも入院時の検体より該当する *E. coli* が分離されていた。2名は同じ施設からの入院であったが、他の4名は自宅からの入院であった。自宅からの入院の4名については、自宅の所在地やリハビリ通所施設等を確認したが共通点は確認できなかった。

*bla*<sub>IMP-1</sub>/Inc HI2/250kbp-300kbpタイプのプラスミドについては2つの医療機関 (FとJ) で分離された4株が保有していた。うち3株は医療機関F分離株由来であった。医療機関Fの3つのプラスミドの類似スコアは580であり、類似割合は580/600=97%であった。一方、医療機関J分離株由来のプラスミドと、医療機関F分離株由来の3つのプラスミドそれぞれの類似スコアは、173、180、182であり、類似割合は86.5%、90.0%、91.0%であった。

## D. 考察

大阪医療センター周辺医療機関において分離された、*bla*<sub>IMP</sub>陽性腸内細菌科細菌のうちの76%が*bla*<sub>IMP-6</sub>であったが残りは*bla*<sub>IMP-1</sub>であり、O病院の事例とは異なる型であった。*bla*<sub>IMP-1</sub>を保有する腸内細菌科細菌が大阪市内の複数の医療機関で分離されたことは、大阪医療センターの関与しないCREの伝播経路が存在することを示唆していた。

一方、O病院の院内感染事例分離株において最も高い割合で認められ、*bla*<sub>IMP-6</sub>の多菌種にわたる拡散に重要な役割を果たしたと考えられるIMP-6/IncN/50kbタイプのプラスミドを、異なる6つの医療機関で分離された10株が保有していた。また、これは今回解析したプラスミドの中で最も多いタイプであった。これらのプラスミドがO病院由来であるかどうかの検討を試みたものの、10個のプラスミドすべてが極めて類似した塩基配列を有しており、疫学情報との相関性を評価することは困難であると考えられた。このタイプのプラスミドは2008年ごろより広島で報告されており、2010年に厚生労働省により実施された実態調査収集株においても比較的高率に存在していた。IMP-6/Inc N/50kbタイプのプラスミドはその遺伝子構造の多様性が比較的少ないにも関わらず、すでに国内で拡散している可能性がある。したがって、我が国の2014年以降の分離株ではその由来を追跡することは極めて困難であると考えられる。また、異なる菌株がこのタイプのプラスミドを保有していた場合、その由来が同じであることを裏付けるためには、サンガー法による塩基配列解析を併用したうえで、それぞれのプラスミドの塩基配列が100%一致することの確認が必要であろう。

医療機関Fでは、IMP-6/IncFII, N, FIBF, FIAF/114kbpのプラスミドを保有する*E. coli*が7例より分離され、*E. coli*の*Xba*IによるPFGE解析ではバンドパターンが一致していた。したがって、このタイプのプラスミドが異なる*E. coli*に水平伝達したのではなく、*E. coli*の菌株事態が患者間に伝播していたと考えられる。ほとんどの患者が入院時検体からの分離であり、院内感染の可能性は低く、また、入院前の共通点もなかった。検体採取時および検査室での汚染の可能性も考えて詳

細に医療記録を確認したがそれらの可能性も低く、その感染経路については不明である。

*bla*<sub>IMP-1</sub>/Inc HI2/250kbp-300kbpタイプのプラスミドについては分離株の疫学情報と、プラスミドの類似性との一致した結果が本研究で得られており、前述のIMP-6/Inc N/50kbタイプ以外のプラスミドでは、必ずしも全塩基配列の詳細な解析を行わなくても疫学的に有用な解析が可能であると考えられた。

臨床検体より分離されるCREが保有するプラスミドの分子疫学解析では、その全塩基配列を確定したうえで、違いを比較検討することが理想的ではある。しかし、解析を要するプラスミド数が多く、かつ疫学調査のようにある程度の迅速性が必要な場合には全塩基配列を確定する手法は目的にそぐわない。疫学調査におけるプラスミド解析では、本法のように、その概略を比較したうえで、より詳細な解析が必要なプラスミドを選別することが必要であると考えられた。実地疫学に活用可能となるプラスミド解析の手法については、今後事例を集積してさらなる検討が必要であろう。

## E. 結論

周辺医療機関より、*bla*<sub>IMP-6</sub>を持つプラスミドを保有する腸内細菌科細菌が複数分離されたものの、このプラスミドの由来を追跡することはその遺伝的多様性の限界により不可能であった。一方で、すでに*bla*<sub>IMP</sub>を持つ複数のタイプのプラスミドが、市内の医療機関で分離される腸内細菌科細菌において拡散している可能性がある。O病院との関連がない医療機関においても、CREが分離された場合には施設内での伝播を防ぐため、確実な感染対策の実施が重要であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 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

## 関西地区の中核病院におけるMBL産生*K. oxytoca*による 院内感染事例のSNPs解析を用いた菌株間関連性に関する研究

研究分担者：石井 良和（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）

研究協力者：青木 弘太郎（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）

**研究要旨** 関西地区の中核病院（O病院）CRE院内伝播事例において分離されたIMP-6産生株を含めた*K. oxytoca* 26株はSNPs解析に基づいた系統解析の結果、5つのサブクラスタに分けられた。病棟毎に特定のクローンが伝播していることが明らかとなり、菌株が収集され始めた時点で既に8系統のクローンの存在が示唆された。SNPs解析により、菌株収集期間以前からの長期に渡る院内伝播が発生していたことが明らかとなった。

### A. 研究目的

2014年3月20日、関西地区の中核病院（O病院）におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: CRE）による大規模アウトブレイクが公表された。2010年7月から2014年3月20日までに、実に114名の患者検体からCREが検出された。そのうち101名から分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生の4菌種（*Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Escherichia coli*および*Enterobacter cloacae*）についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による分子疫学的菌株タイピングを実施したところ、*K. oxytoca*のみがクローナルであった。我々は、MBL産生*K. oxytoca*についてPFGEよりさらに詳細な菌株間の関連性を明らかにするべく、次世代DNAシーケンサー（NGS）にて解読したデータを用いて、一塩基多型（SNPs）による系統解析を行った。

### B. 研究方法

2011年12月2日から2014年1月14日大阪医療センターにおいて分離されたMBL産生*K. oxytoca* 26株および、高病原性を示すクローンであるか否かの判断をするべく、2013年12月4日から2014年11月25日までに東邦大学医療センター大森病院において血液培養から分離された*K. oxytoca* 3株に

ついても供試した。菌種再同定および薬剤感受性試験はPhoenix（日本BD）を（感受性カテゴリの判定にはCLSI M100-S22の定義に基づいた）、MBL（IMP-1、IMP-2、VIM-1、VIM-2 およびNDMグループ）遺伝子のPCRでの検出には既報の方法を用いた<sup>1,2)</sup>。ベンチトップ型NGSのMiSeq（イルミナ）にてペアエンドリード（300bp×2）の解読を行い、アセンブルにはCLC genomics workbench（CLC bio）を、Multilocus sequence typing（MLST）、外来性薬剤耐性遺伝子検索およびプラスミドレプリコンタイピングはCGE server（<http://www.genomicepidemiology.org/>）のMLST1.7, ResFinder2.1およびPlasmidFinder1.2を用いた。

SNPs解析には、NCBI *K. oxytoca* Genome Assembly and Annotation report（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1165>）よりコンプライートゲノム配列5株分、ドラフトゲノムのスキヤフォールドもしくはコンティグ配列19株分の計24株分を加えた。SNPsによる系統樹を作成する前段階の検討として、*rpoB*全長配列（4,029bp）に基づいた系統樹をMEGA5の近隣結合法（NJ法）にて作成した。SNP抽出のためのマッピングのリファレンス配列には、*K. oxytoca* KONIH 1株（Accession No. CP008788）を用いた。マッピングにはBWA、SNPの抽出にはsamtools

mpileupおよびVarScanというソフトウェアを用いた。リファレンス配列についてのPHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) 解析にてヒットしたファージ領域および供試菌株間でSNPsが抽出されなかった箇所(塩基)については、*K. oxytoca*に共通して有している配列(つまりコアゲノム)ではないとみなし、抽出SNPsから除外した。抽出SNPsの系統解析にはRAxMLを用い、ブートストラップは1,000回とした。系統樹の描画にはFigTreeを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、東邦大学医学部倫理委員会より承認を受けた“全国医療施設からの臨床分離菌株の薬剤耐性および遺伝型の依頼解析”の一環として実施した(東邦大学医学部倫理委員会承認番号: 25032)。

### C. 研究結果

O病院分離株は全て*K. oxytoca*と同定された。薬剤感受性検査成績のうち各種薬剤耐性率を表1に示した。PIPC/TAZ、IPMおよびAMKに対して耐性を示す菌株はなかった。

SNPs解析の前検討として作成した、*rpoB*全長配列に基づいた系統樹(図1)において、NCBIデータベースの1株(10-5246株)および大森病院血液由来の1株(東邦大学管理番号:TUM14709)が大きく外れた箇所に位置し、むやみなSNPs数の増大が示唆されたため、当該の2株を以降の解析から除外した。

抽出SNPsに基づいた系統樹を図2に示した。全体で497,742 SNPsが検出された。大阪医療セ

表1 O病院において分離された*K. oxytoca*の薬剤耐性率(n=26)

薬剤	耐性率
アミカシン(AMK)	0.0
ゲンタマイシン(CM)	30.8
イミペネム(IPM)	0.0
セフトリアキソン(CEF)	100.0
セフトラゾラム(CEZ)	100.0
セフトラゾラム/チアモキサール(CMZ)	100.0
セフトロキサム(CPD)	100.0
セフトロキサム(CAZ)	100.0
セフトロキサム(CTX)	100.0
モキサリクタム(MOX)	53.8
セフェピム(CFPM)	84.6
アズトレオナム(AZT)	100.0
アンピシリン(ABPC)	100.0
ピペラシリン(PIPC)	100.0
アンピシリン/スルバクタム(ABPC/SBT)	73.1
ピペラシリン/タゾバクタム(PIPC/TAZ)	0.0
サルファメソキサゾール/トリメトプリム(ST)	100.0
ガチフロキサシン(GTFX)	92.3
レボフロキサシン(LVFX)	46.2
ミノサイクリン(MINO)	11.5

ンターにおいて分離された26株およびNCBIデータベースにおける2株(MGH27株および10-5242株)は同一のクラスタに属し、ST29に属する菌株であった。大森病院血液由来2株(TUM14707および14708株)はいずれも大阪医療センターの菌株とは別のクラスタに属する菌株であった。ST29に属する菌株のみで作成した系統樹を図3に示した。図3では大阪医療センターにおいて分離された菌株のみでクラスタを形成した。

図4にO病院の26株のみの系統樹に合わせて菌株の臨床情報、MLST、PCRの結果、薬剤耐性遺伝子検出結果、プラスミドのレプリコン遺伝子検出結果および薬剤感受性検査成績を示した。

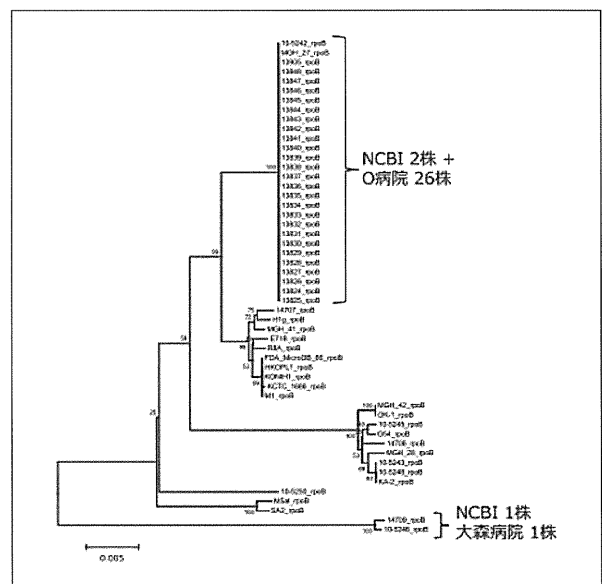


図1 *rpoB*全長配列(4,029bp)に基づいた系統樹(NJ法)

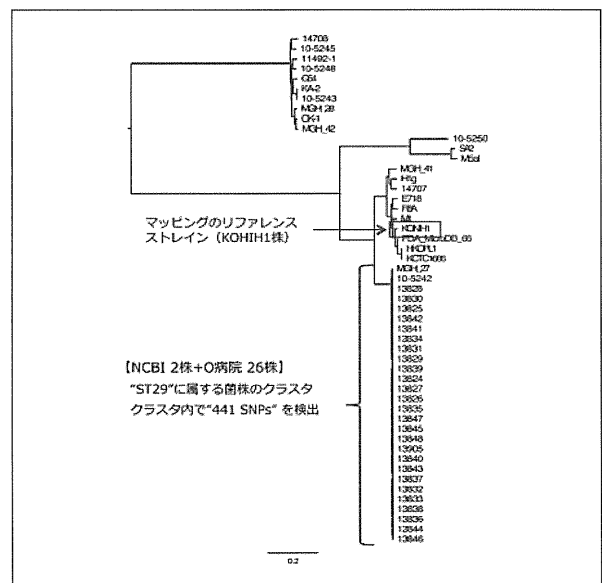


図2 SNPsに基づいた系統樹(51株)



PCRにおいて、IMP-1グループに属する酵素をコードする遺伝子（以下、IMP-1G 遺伝子）が検出されたのは26株のうち14株のみであった（図4）。IMP-1G 遺伝子が検出されなかった菌株については、IMP-2グループ、VIM-1グループ、VIM-2グループ、およびNDMグループに属する酵素をコードする遺伝子についても検出されなかった。系統樹全体で135 SNPsが検出された。菌株は大きくAおよびBのクラスタに分けられた。クラスタAは

A1およびA2、クラスタBはB1、B2およびB3の5クラスタに分けられた。サブクラスタB2に属するTUM13848および13905株においては、受付日、材料および患者IDが同一であった上、SNPが検出されなかった。クラスタAに属する菌株ではTUM13828株を除いてIMP-6遺伝子が検出された。さらに本遺伝子はプラスミドの不和合性 (incompatibility) を規定している Inc N group の複製遺伝子 *repA* と同一コンティグ上に見出された。また、クラスタBでは各サブクラスタに属する菌株でのIMP-6 遺伝子の検出の有無が異なった。TUM13848株に限ってはIMP 遺伝子をPCRで検出出来たが、NGSでは構造遺伝子全長が検出出来ず、結果が一致しなかった。

図5に大阪医療センターの分離株のみの系統樹をラジアル表記で示し、各サブクラスタに属する菌株の分離時期、病棟、診療科およびサブクラスタ内のSNPs数を併記した。また、大阪医療センターの病棟案内についても示した。さらに、図6には各サブクラスタ内の隣接する菌株間のSNPs数および分離期間を示した。サブクラスタA1は3週間の間に東8病棟にて2株分離され、3SNPsが検出された。サブクラスタB2はTUM13829および13831株が2週間の間に別病棟（東11および西9病

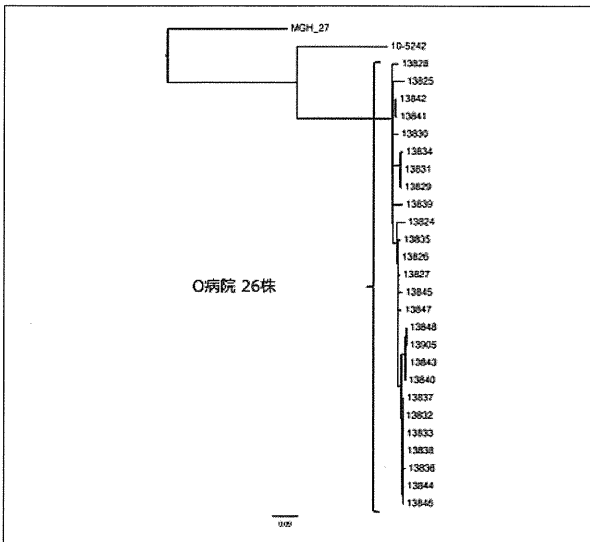


図3 SNPsに基づいた系統樹 (ST29に属する菌株28株)

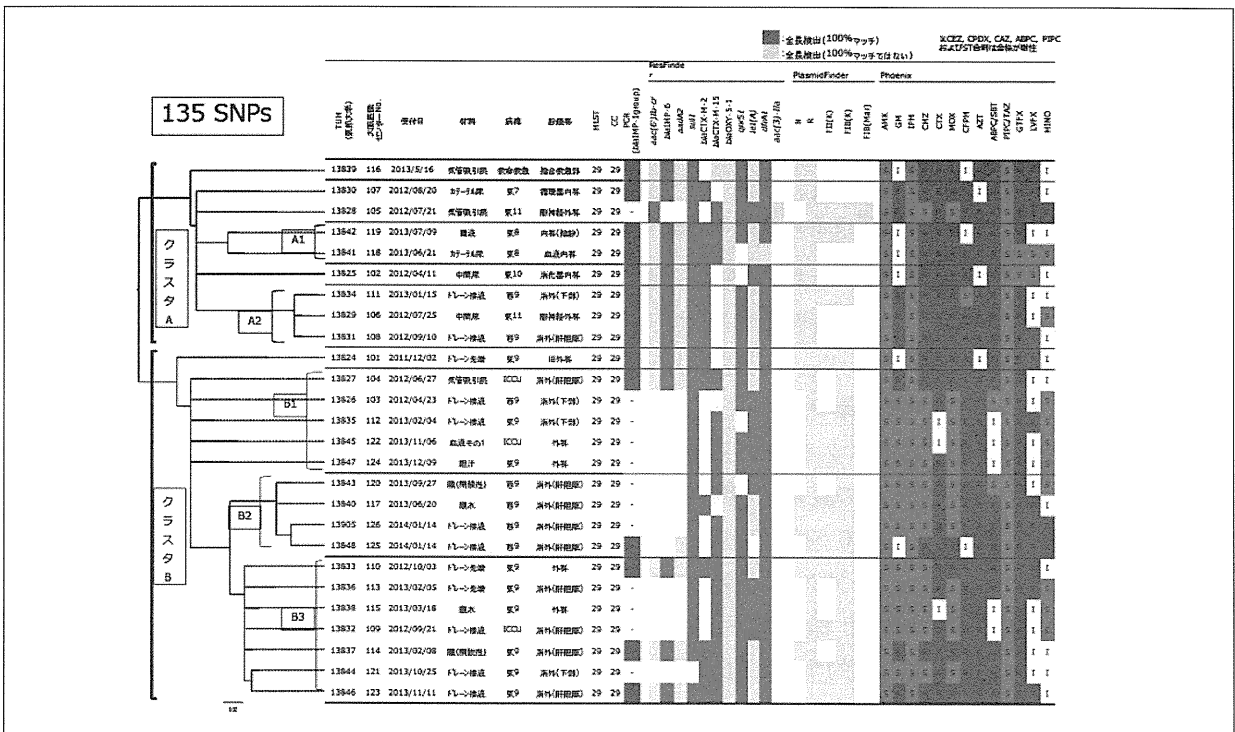


図4 SNPsに基づいた系統樹 (O病院分離株のみ) および各種解析結果

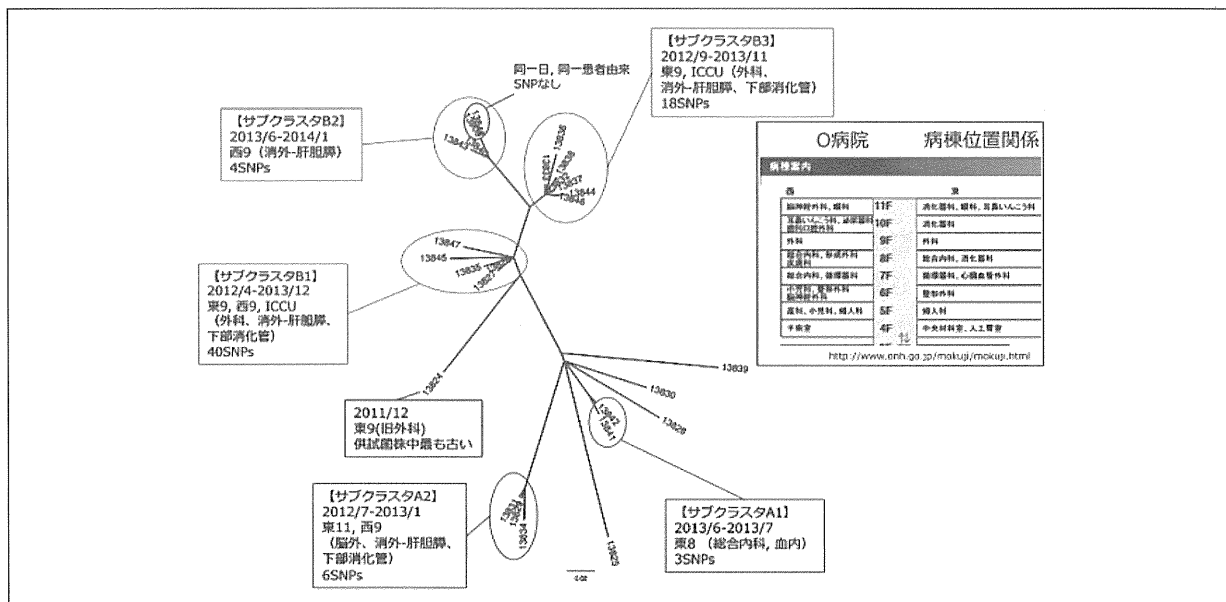


図5 SNPsに基づいたラジアル系統樹 (O病院分離株のみ)

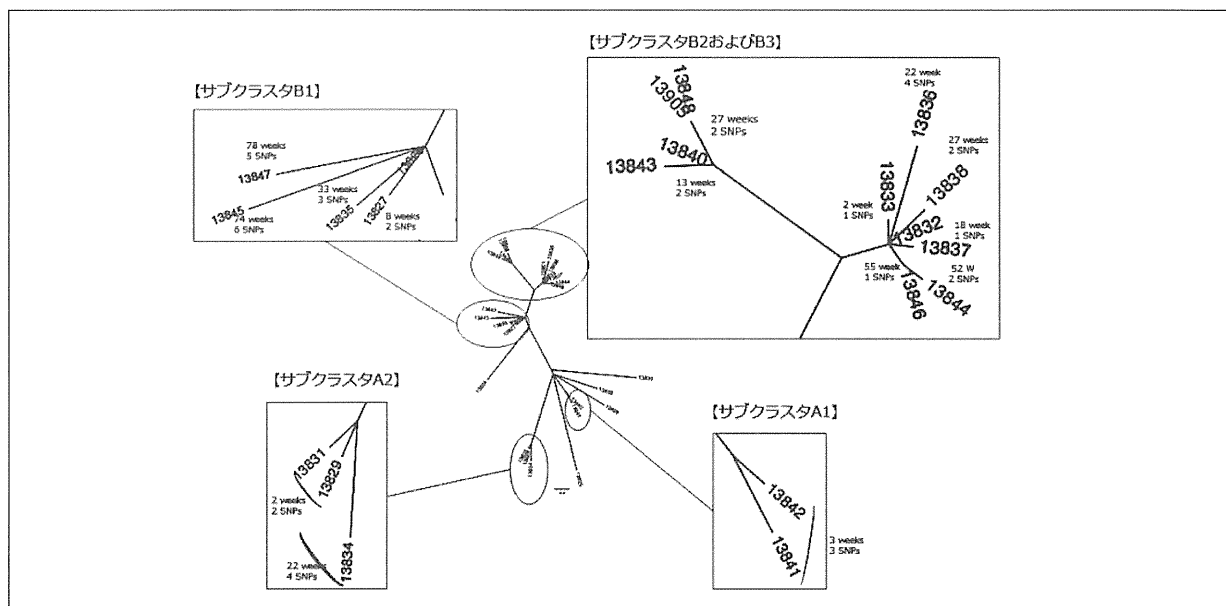


図6 各サブクラスタ内の隣接する菌株間のSNPs数および分離期間

株)で分離され2 SNPsが検出された一方で、上記2株とTUM13834株は22週間の期間を空けて分離されているにもかかわらず、4 SNPsのみが検出された。クラスタBの分離株は主に9階の外科病棟から分離された。サブクラスタB1およびB3は1年3ヶ月～1年8ヶ月の長期に渡り菌株が分離されており、それぞれ40 SNPsおよび18 SNPsが検出された。また、サブクラスタB2においては半年の間に4株(うち2株は同一株)が分離されており、こちらは比較的少ない4 SNPsが検出された。

図7にはIMP-6産生*K. oxytoca*の分離時期と

系統関係から想定される祖先を示した。枝分かれする以前の実際に分離された祖先と考えられる株を黒丸で、存在したであろう架空の祖先を白抜きの丸で示した。

#### D. 考察

O病院で分離されたIMP-6産生*K. oxytoca* 26株では、MBL産生株であるにもかかわらずIPMに耐性を示す菌株は認められなかった。IMP-6はIMP-1に比較して、IPMの分解効率が約2倍悪く、MEPMの分解効率が約3倍良いというカイネティクスパラメータが報告されており、これら

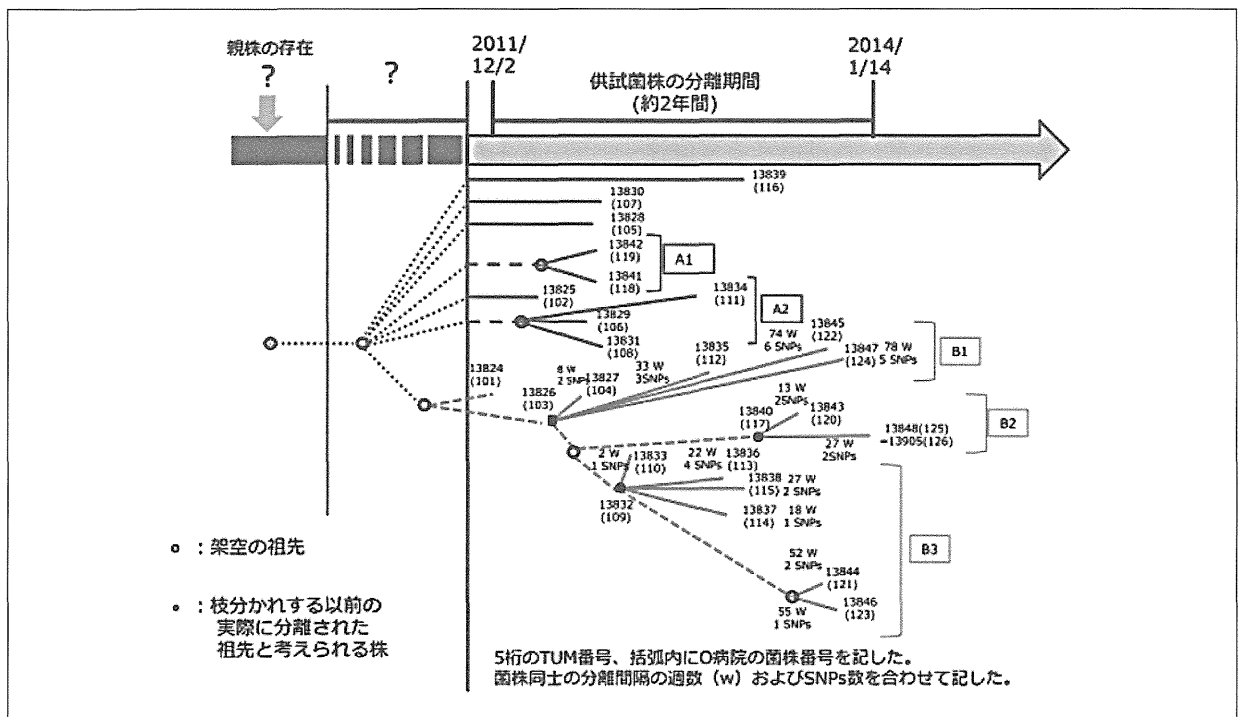


図7 IMP-6産生*K. oxytoca*の分離時期と系統関係

の表現型を支持すると考えられる<sup>3)</sup>。

本検討では、東邦大学医療センター大森病院において約1年間に血液材料から分離された*K. oxytoca* 3株を解析に含めた。分離期間から、*K. oxytoca*が血液から分離されることは非常に稀であることが読み取れ、本菌種は元来、侵襲的な病原性は低いことが推測された。ところが、本事例においてはドレーン排液など、本来無菌的な部位からの分離が多く、高病原性のクローンかつMBL産生株である可能性が想定された。しかし、SNPsを用いた系統解析から大森病院における血液由来株(TUM14707および14708株)と大阪医療センターにおける分離株は別々のクラスタに属する菌株であることが示された(図2)。

SNPsに基づいた系統樹において、クラスタBでは同一のサブクラスタに属する菌株にもかかわらず、IMP-6遺伝子の保有が確認されなかった菌株が16株中11株存在した。本菌株は大阪医療センターにおいてMBL産生性の確認がなされていたことから、分離時点ではその他の菌株と同様にIMP-6遺伝子を宿すプラスミドを保有していたことが想定された。抗菌薬による選択圧が存在しない中で菌株の保存、輸送および培養のいずれかの時点で当該プラスミドが脱落した可能性が考えられた。また、TUM13848においてはNGSで

IMP-6遺伝子の全長が検出出来なかったのは、当該領域におけるシーケンスリードの偏りがあり、カバレッジが不十分であったことが考えられた。

SNPsに基づいた系統樹は5つのサブクラスタに分けられた。サブクラスタA1、A2に属するTUM13829および13831株、およびサブクラスタB3に属するTUM13832および13833株は1ヶ月以内の間隔で分離された菌株であった。上記の菌株同士は1~2週間でコアゲノム上に1 SNPが入ると推計される頻度であった(図6)。その他の菌株については、分離時期が離れているにもかかわらず、SNPsの数が少ない(4~55週間で1 SNP)ため、菌が増殖出来ずに留まっていた環境が病棟内にあったことが推測された。分離時期と系統関係(図7)より、菌株の収集開始時点において、既に少なくとも8つの系統に分かれていたことが示唆され、より以前から院内伝播が発生していたと考えられた。クラスタBに属する菌株は分離期間内に分岐前の菌株(TUM13826株)が分離されており、そこから直接サブクラスタB1へ、また、サブクラスタB2およびB3はTUM13840および13832株がさらなる伝播の親株となったことが示唆された。いずれの菌株も祖先は同一株であると考えられるが、本検討からはいつからIMP-6

産生 *K. oxytoca* が存在したのかは不明である。SNPs 数と時間の情報を組み合わせた分子時計解析を組み込み、祖先の存在時期を推定することは、実地疫学に基づいた感染対策に貢献出来る可能性がある。

## E. 結論

収集期間が長期に渡る耐性菌の院内伝播事例において、NGS 解読データを用いた SNPs に基づく系統解析を行うことで、収集期間以前から院内伝播が発生していたことが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## H. 引用文献

- 1) Shibata N, Doi Y, Yamane K, *et al.* PCR Typing of Genetic Determinants for Metallo- $\beta$ -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 5407-13.
- 2) Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; 55: 934-6.
- 3) Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45: 1343-8.

## I. 謝辞

本研究を行うにあたり、SNPs に基づいた系統解析手法をご教示頂いた国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターの黒田 誠先生および関塚 剛史先生に深謝致します。