

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 健康人より分離された 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)
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)
中根 邦彦 (同上、大学院博士過程 3 年、岡崎市保健所)

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、我々は健康人の約数%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、健康人由来 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 月の間に健康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, IncII 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、我々は健康人の約数%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康人糞便由来 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 ≥ 256μg/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的(MIC ≤ 64μg/ml)を示し、1株(0.7%)が中間(MIC 128μg/ml)、8株(5.8%)が耐性的(MIC ≥ 256μg/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, IncI1 type 2株, IncFII type 2株であり、pMLST解析の結果、IncI1 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IncI1 typeのプラスミド(No. 559)は*fosA3*の上流にIS903, *bla*_{CTX-M-14}, *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*bla*_{TEM-1}, *orf477*, *bla*_{CTX-M-55}, *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代セファロsporin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、すでに広が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

なし

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. 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. 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. 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