

## 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

### 分担課題 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・病原微生物研究室・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・上級研究員)

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、昨年度に引き続き 2014 年度に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株において当研究部が開発した 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を用いて迅速診断し、これら薬剤耐性因子の動向を明らかにすると共に、IMP のタイピングを実施した。その結果、AAC(6')-Ib の増加とメロペネムにより耐性を示す IMP 亜型の出現が明らかとなった。

### 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を開発を目指す。

### B. 研究方法

1. 2014 年多剤耐性緑膿菌臨床分離株の分子疫学解析

2014年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株 304 株に対し、AAC(6')-Ib、AAC(6')-Iae および IMP-type メタロ-β-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 においてはシーケンスにより亜型を判定し、2013 年度分離株と比較した。

## 2. IMP-34 産生緑膿菌の全ゲノム配列の解析および IMP-34 の酵素活性

IMP-34 産生多剤耐性緑膿菌 NCGM1900 のゲノムを CTAB 法で抽出し、沖縄総合科学研究所にゲノム解析を依頼、PacBioRSII でシーケンスし、Minimus2 でアセンブルした。完全長の配列はアノテーションし、DDBJ に登録した。IMP-1 および IMP-34 産生緑膿菌を用いて pHSG389-blaIMP-1 および pHSG389-blaIMP-34 を得た。大腸菌 DH5 にトランスフォームしたトランスフォーマントを用いて種々の β-ラクタム剤に対する MIC を比較した。さらに、リコンビナント IMP-1 および IMP-34 を生成し、酵素学的性状を明らかにした。

### 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. 2014 年多剤耐性緑膿菌臨床分離株の分子疫学解析

2014 年に分離された 304 株を解析した結果、IMP 陽性 176 株（57.9%）、AAC(6')-Iae 陽性 115 株（37.8%）、AAC(6')-Ib 陽性 107 株（35.1%）であった（Table 1）。2013 年分離株 298 株は IMP 陽性 169 株（56.7%）、AAC(6')-Iae 陽性 129 株（43.3%）、AAC(6')-Ib 陽性 89 株（29.9%）であったことから（Table 2）、AAC(6')-Iae 陽性株の分離率が減少し、AAC(6')-Ib 陽性株の分離率が増加したことが明らかとなった。

2014 年分離株の IMP タイプをシーケンスにより決定した結果、IMP-1: 99 株、

IMP-6: 7 株、IMP-7: 29 株、IMP-10: 32 株、IMP-34: 1 株、IMP-43: 8 株であった。

### 2. IMP-34 産生緑膿菌の全ゲノム配列の解析および IMP-34 の酵素活性

IMP-34 産生多剤耐性緑膿菌 NCGM1900（Accession no. AP014622）の完全長のゲノム配列を明らかにした結果、aac(6')-Ib および IMP-34 を含むインテグロン *tnpA-intI-bla<sub>IMP-34</sub>-aac(6')-Ib-qacEdeltaI-sulI-orfX-tniBdelta-tniA* が同一ゲノム上に 2 か所確認された（Fig. 1）。

pHSG389-blaIMP-1 および pHSG389-blaIMP-34 のトランスフォーマントを用いて種々の β-ラクタム剤に対する MIC を比較した結果、pHSG389 を持つコントロールと比較するとアズトレオナム以外の β-ラクタム剤に対する MIC が上昇していたが、pHSG389-blaIMP-1 および pHSG389-blaIMP-34 の比較では違いが見られなかった（Table 3）。また、酵素活性の比較では IMP-34 は IMP-1 に比べて全体的に低い活性を示した（Table 4）。

## D. 考察

### 1. 2014 年多剤耐性緑膿菌臨床分離株の分子疫学解析

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 産生菌の増加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。

### 2. IMP-34 産生緑膿菌の全ゲノム配列の解析および IMP-34 の酵素活性

2011 年より IMP-34 産生多剤耐性緑膿菌が分離されるようになった。blaIMP-34 は広

島県で分離された *Klebsiella pneumoniae* のプラスミドから同定された。この blaIMP-34 がプラスミドから緑膿菌の染色体上に転移した可能性が考えられる。また、同一染色体上に aac(6')-Ib および IMP-34 を含むインテグロンが 2 か所存在することで、より多くの酵素を産生している可能性が示唆された。

#### E. 結論

本研究から AAC(6')-Iae 陽性株が減少し、AAC(6')-Ib 陽性株が増加していた。また、IMP-34、IMP-41、IMP-43 および IMP-44 を含むメロペネムにより耐性を示す IMP タイプメタロメタロ-β-ラクタマーゼがいくつかの地域で分離されていることが明らかとなり、今後も注意深くモニタリングしていく必要がある。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Shimada K, Ohara H, **Kirikae T**, Pokhrel BM. Identification of a novel 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase, AAC(6')-Iak from a multidrug-resistant clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(10): 6324-6327
- 2) Tada T, Shrestha B, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Ohara H, **Kirikae T**, Pokhrel BM. NDM-12 a novel New Delhi metallo-β-Lactamase variant from a carbapenem-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(10): 6302-6305
- 3) Tojo M, Mawatari M, Hayakawa K, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, Sugiki Y, Kuroda E, Takeshita N, Kustuna S, Fujiya Y, Miyoshi-Akiyama, **Kirikae T**, Ohmagari N.: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a traveler returned from Brunei. *J Infect Chemother.* 2014; in press.
- 4) Tojo M, Nagamatsu M, Tanaka M, Narahara K, Miyoshi-Akiyama, **Kirikae T**, Ohmagari N.: Evaluation of an automated rapid diagnostic test for detection of *Clostridium difficile*. *PLoS One.* 2014; 9(8): e106102
- 5) Tojo M, Tada T, Shimojima M, Tanaka M, Narahara K, Miyoshi-Akiyama T, **Kirikae T**, Ohmagari N. Dissemination in Japan of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing IMP-type metallo-β-lactamases and AAC(6')-Iae/AAC(6')-Ib. *J Infect Chemother.* 2014; 20(9):586-588
- 6) Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama, **Kirikae T**, Nagamatsu M, Shimada K, Mezaki K, Sugiki Y, Kuroda E, Kubota S, Takeshita N, Kutsuna S, Tojo M, Ohmagari N.: Molecular and Epidemiological Characterization of IMP-Type Metallo-β-Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae* in a Large Tertiary Care Hospital in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(6): 3441-3450
- 7) Tojo M, Fujita T, Ainoda Y, Nagamatsu M, Hayakawa K, Mezaki K, Sakurai A, Masui Y, Yazaki H, Takahashi H, Miyoshi-Akiyama, Totsuka K, **Kirikae T**, Ohmagari N.: Evaluation of an automated rapid diagnostic assay for detection of Gram-negative bacteria and their drug-resistance genes in positive blood cultures. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94064
- 8) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, **Kirikae T**. Biochemical analysis of metallo-β-lactamase NDM-3 from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(6):3538-3540
- 9) 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-coproducers in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(5):2916-2920
- 10) Hashimoto A, Nagamatsu M, Ohmagari N, Hayakawa K, Kato Y, **Kirikae T**.: Isolation of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella*

*pneumoniae* from a traveler returning from a foreign country to Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2014; 67(2): 120-121

- 11) 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;14(1):56.

and -44 producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan、第 87 回日本細菌学会総会、平成 26 年 3 月、東京都船堀

- 2) 多田達哉・秋山徹・島田佳世・切替照雄、日本の医療施設で分離される多剤性緑膿菌株の分子疫学解析、第 43 回薬剤耐性菌研究会、平成 26 年 10 月、金沢

## 2. 学会発表

- 1) 多田達哉・秋山徹・切替照雄. IMP-43

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

### AAC(6')-lae and/or IMP-type MBLs産生菌

		IMP-type MBLs		
		Positive	Negative	Total
AAC(6')-lae or -lb	AAC(6')-lae Positive	110	5	115 (37.8%)
	AAC(6')-b Positive	50	57	107 (35.1%)
	Negative	16	66	82
	Total	176 (57.9%)	128	304

**Table 1**

### AAC(6')-lae and/or IMP-type MBLs産生菌

		IMP-type MBLs		
		Positive	Negative	Total
AAC(6')-lae or -lb	AAC(6')-lae Positive	118	11	129 (43.3%)
	AAC(6')-b Positive	42	47	89 (29.9%)
	Negative	9	71	80
	Total	169 (56.7%)	129	298

**Table 2**

Antibiotic(s) <sup>a</sup>	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	<i>P. aeruginosa</i> NCGM1900	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pHSG398/IMP-1)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pHSG398/IMP-34)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pHSG398)
Ampicillin	>1,024	32	32	2
Ampicillin-Sulbactam	512	16	16	1
Aztreonam	16	<0.25	<0.25	<0.25
Cefepime	1,024	2	2	2
Cefotaxime	>1,024	16	16	<0.25
Cefoxitin	>1,024	512	512	2
Cefozopran	1,024	4	4	<0.25
Cefpirome	256	0.25	0.5	<0.25
Ceftazidime	>1,024	512	512	<0.25
Ceftriaxone	>1,024	64	64	<0.25
Cefuroxime	>1,024	256	128	4
Cephadrine	>1,024	256	256	16
Doripenem	256	0.25	<0.25	<0.25
Imipenem	256	0.5	0.25	<0.25
Meropenem	512	0.5	0.25	<0.25
Moxalactam	>1,024	64	64	<0.25
Penicillin G	>1,024	128	128	32

<sup>a</sup>The ratio of the ampicillin to sulbactam was 2:1.

**Table 3**

Kinetic parameters of  $\beta$ -lactamase IMP-1 and IMP-34 with various substrates

Substrate	<i>Km</i> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>		<i>kcat</i> ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>a</sup>		<i>kcat/Km</i> ( $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	
	IMP-1	IMP-34	IMP-1	IMP-34	IMP-1	IMP-34
Penicillin G	662	423	94	49	0.14	0.12
Ampicillin	340	355	16	13	0.048	0.037
Cephadrine	73	57	21	15	0.29	0.26
Cefoxitin	34	31	2.7	2.0	0.080	0.066
Cefotaxime	14	10	2.9	2.0	0.21	0.20
Ceftazidime	26	22	0.68	0.4	0.026	0.019
Cefepime	21	29	1.4	2.4	0.064	0.084
Aztreonam	NH <sup>b</sup>	NH <sup>b</sup>	NH <sup>b</sup>	NH <sup>b</sup>	NH <sup>b</sup>	NH <sup>b</sup>
Dripenem	39	39	4.8	3.8	0.12	0.096
Imipenem	58	59	6.9	4.9	0.12	0.083
Meropenem	37	46	2.3	2.0	0.062	0.043

<sup>a</sup>The *Km* and *kcat* values represent the means of three independent experiments  $\pm$  standard deviations.

<sup>b</sup>NH; no hydrolysis was detected under conditions with a substrate concentration of up to 1mM and an enzyme concentration of up to 700nM.

**Table 4**

同構造のインテグロンカセットが染色体上に2か所

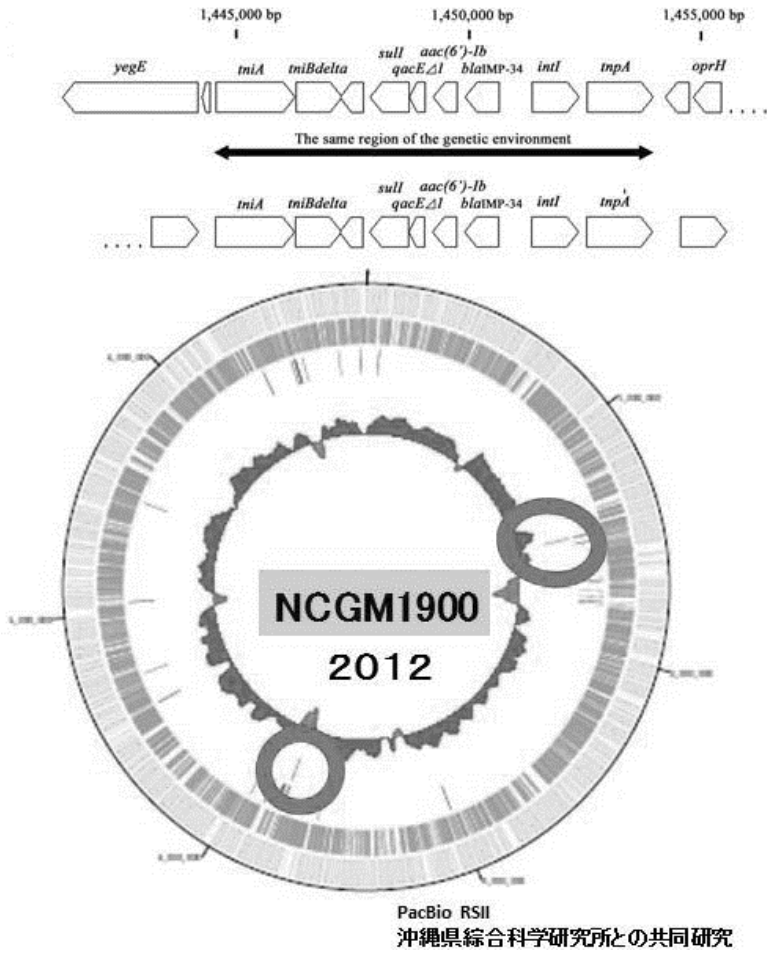


Fig. 1