

## 関する研究(北仲、他)

国内の外傷患者の血液培養から分離されたカルバペネム耐性アシネトバクター属菌は *Acinetobacter soli* と同定され、そのカルバペネム耐性には TMB-2 と命名された新しいメタロ-β-ラクタマーゼの産生が関与していることが明らかとなった。

## 4. ホスホマイシン高度耐性アシネトバクター属菌に関する研究(北仲、他)

上述の外傷患者の血液培養で検出されたカルバペネム耐性アシネトバクター属菌のインテグロン構造を解析する過程で、新しいホスホマイシン耐性遺伝子 *fosK* を発見した。

## 5. 多剤耐性を獲得した腸内細菌科の臨床分離菌に関する研究(長野則之、他)

海外から帰国した患者より分離された広範囲のセフェム系薬やカルバペネムに耐性を獲得した肺炎桿菌や大腸菌は、OXA-48 や OXA-181 型などのカルバペネマーゼを産生することが確認された。特に、OXA-181 産生株は NDM-1 も同時に産生する株であり、広範囲多剤耐性株であった。

## 6. ペニシリンに感性であるがセフチブテンに耐性を獲得した B 群レンサ球菌に関する研究(長野則之、他)

セフチブテン耐性であるがペニシリン感性と判定される B 群レンサ球菌は、PBP2X と PBP2B に、それぞれ T394A と T567I というような共通したアミノ酸置換を有していた。

## 7. セフチゾキシムに高度耐性を獲得した B 群レンサ球菌に関する研究(木村、他)

国内の医療機関で分離されたセフチゾキシムに高度耐性(MIC, 256 μg/ml)を示す B 群レンサ球菌について PBP の解析やアリの交換実験などを実施した。その結果、その株では PBP2X の Q557E 置換に加え、PBP1A に G539S 置換を獲得することにより、セフチゾキシム高度耐性を示すことが示唆された。

## 8. 非溶血性で小コロニー形態を示す PRGBS の解析(坂野、木村、他)

臨床分離された PRGBS の中に羊血液寒天培地上で小コロニー形態を呈し、しかも非溶血性を示す株について解析を行なった結果、この株は、溶血活性に関与するとされている CylK の C 末端部分が欠損していることが明らかとなったが、小コロニーを形成する機構については、解析を継続中である。

## 9. QnrA 保有大腸菌の特性に関する解析(後藤、川村、他)

FQ に感性の大腸菌 O25:H4-ST131 を用いて QnrA の影響を解析したところ、QnrA は、MIC 程度の濃度の FQ 存在下で、菌株の死滅を防止する効果が、他の PMQR である AAC(6′)-Ib-cr や QepA より強い事が確認された。その結果、QnrA を保有する株は、FQ に対し段階的に耐性を獲得しつつ最終的に高度耐性を示す事になる可能性が示唆された。

## b. 多剤耐性菌等の調査研究

### 1. 健常者から分離されたホスホマイシン耐性大腸菌の解析(佐藤、川村、他)

国内で健常者より分離されたホスホマイシン耐性大腸菌について PCR 増幅と DNA の塩基配列の決定を行った結果、国内ではじめて健常者から *fosA3* を保有する大腸菌を検出した。

### 2. フルオロキノロン耐性肺炎桿菌の分子疫学解析(永坂、他)

国内の 23 医療機関で分離されたセフェム耐性肺炎桿菌の中から、フルオロキノロン耐性株を抽出し、それらの株の遺伝的特長について解析を行った結果、海外で NDM-1 や OXA-48 などの産生菌として既に問題となっている国際流行型の遺伝型である ST37、CC17 (ST17 と ST20 からなる)、ST11 などの国際流行株が、48%を占めていることが明らかになった。

### 3. PRGBS の多剤耐性獲得状況に関する研究(木村、他)

国内の医療機関で臨床分離されたペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌(PRGBS)について、マクロライドおよびフルオロキノロンに対する耐性獲得状況を調査した結果、PRGBS と判定される株の 100%が FQ に非感性、47%がエリスロマイシンに非感性と判定され、ペニシリン感性 GBS(PSGBS)と比べた場合、有意に耐性率が高い事が確認された。

### 4. 市販食肉等由来大腸菌の分子疫学解析(川村、他)

国内のマーケットで生の鶏肉等の食品を購入し、それらから分離された大腸菌について、ESBL などの遺伝子を検出し解析した結果、ヒト臨床検体より分離されやすい O25:H4-ST131 はそれ程多く無く、また、それ

らは FQ に感性であった。さらに O8 や O 型不明の株が多かったことから、ヒトで分離しやすい ESBL 産生菌は、食肉などの食品から直接由来しているのでは無いことが示唆された。

#### 5. 肺炎患者の血液由来肺炎桿菌の分子疫学解析(伊藤、他)

細菌性肺炎の患者の血液培養で分離された肺炎桿菌について、それらの遺伝的特性を解析した結果、遺伝的に ST65 やそれと遺伝的に関連する genetic group 65(GL65)と定義した遺伝型の株が、肺炎時に血液に侵入しやすいことが示唆された。

#### 6. ペニシリン低感受性 GBS が院内感染について報告した(長野則之、他)

ペニシリン低感受性 GBS(PRGBS)については、院内でどの程度患者間で伝播するのかしないのか不明であったが、1 医療機関で PRGBS 株が複数の患者から臨床分離された。そこで、それらの株について分子疫学的な解析を行なった結果、それらは遺伝的にクローナルな関係にあり、院内伝播した可能性が強く示唆された。

#### 7. メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の簡便試験法の比較評価(服部、川村、他)

メタロ-β-ラクタマーゼ産生株を検出する複数の試験検査法についてその感度、特異度を比較解析した。その結果、我々が開発した SMA disk 法は、他の検査法と比べて特異度や感度とも、日常的な検査に十分使用可能であることが確認された。

#### 8. 臨床分離株における PRGBS の調査(木村、他)

1977 年より 2005 年にかけて臨床分離された 349 株の GBS について PRGBS の分離率を調査した結果、PRGBS は、1995 年以前の保存株では確認されなかった。

#### 9. 妊婦から分離された GBS の調査(木村、他)

2007 年から 2008 年にかけて神戸市内の病院で妊婦より臨床分離された 139 株の GBS について PRGBS の分離率を調査した結果、妊婦分離株からは 2008 年の時点で PRGBS は検出されることが確認された。

#### 10. 臨床分離された A 群レンサ球菌におけるペニシリンに対する感受性の調査(鈴木健史、木村、他)

2010 年～2012 年に臨床分離された 256 株の A 群レンサ球菌 (GAS) についてペニシリンに対する感受性状況を調査した結果、ペニシリンに低感受性や耐性を獲得した GAS 株は確認されなかった。

#### c. 新規の簡便試験法等の開発と評価

##### 1. ホスホマイシン不活化酵素産生株の簡便識別検査法の開発(中村、和知野、他)

近年、ホスホマイシン修飾・不活化酵素を産生し、ホスホマイシン耐性を獲得した大腸菌が日本、韓国、中国などの東アジア地域で散見されるようになった。そこで、本耐性機構を持つ菌株を簡便に識別するディスク拡散試験法を構築した。本方法はホスホマイシン修飾・不活化酵素の酵素活性が、ホスホノギ酸によって阻害されることを利用している。不活化酵素産生株においては、ホスホノギ酸存在下で、ホスホマイシンディスク周囲の阻止円拡大が認められる。本検査法は安価で簡便であるため、細菌検査室において、ルーチンの薬剤耐性菌検査法として、今後の普及が期待される。

##### 2. 多剤耐性アシネトバクターの迅速菌種同定と国際流行クローンの簡便識別法の開発(鈴木匡弘、他)

医療機関の検査室の業務では、菌種の同定が難しい *Acinetobacter* 属菌について、迅速・簡便に菌種を同定し、さらに *A. baumannii* の場合は、国際流行クローンか否かを迅速に識別できる解析法を開発した。具体的には、データベース上に登録された多数の *Acinetobacter* 属菌のゲノムデータを比較解析し、属特異的、クローン特異的な遺伝子などを選定し、それらをマルチプレックス PCR で増幅し、増幅された DNA バンドのパターンに基づき属やクローンを判別するという方法である。この方法を用いて、海外帰国患者から分離された 2 株の多剤耐性アシネトバクターを解析し、1 株は *A. baumannii* IC1、もう 1 株は、*A. baumannii* IC2 に近い株と判定された。そこで MLST 解析を実施したところ、前者は ST1(IC1)、後者は ST2 と 3 アリル異なる ST215 と判定され、新しい解析法の信頼性が確認された。

##### 3. GBS を高感度かつ迅速に検出する LAMP 法の開発(木村、他)

GBS に特異的な *cfb* 遺伝子を指標にして新生児髄膜炎の原因となる GBS を迅速に検出、鑑別可能な LAMP 法を開発した。この方法について 17 の *Streptococcus* 属の菌種を用いて検証したところ、迅速かつ高感度に GBS の保菌を確認できることが明らかとなり、妊婦の GBS スクリーニングにおいて、培養検査や CAMP テストに置き換えることが可能になると考えられた。

#### 4. 自動検査装置による PRGBS の検出感度の評価(木村、他)

VITEC(R)2 システムを用いた場合、PRGBS であっても、半数の株しか PRGBS と判定できないことが明らかとなった。

#### d. その他

##### 1. PRGBS 等の分類に関する提案を行なった(木村、他)

ペニシリンやセファロスポリンに低感受性や耐性を獲得した GBS が近年多く分離されるようになりその報告も増加しつつあることから、それらについての研究をする上で混乱等が発生しないように分類法を国際的に提案した。

##### 2. 16S rRNA メチレースに関する英文総説の執筆(和地野、他)

プラスミド媒介性の 16S rRNA メチル基転移酵素(メチレース、メチルトランスフェラーゼ)として RmtA~RmtH、ArmA さらに NpmA など様々な変種(variants)やタイプが出現しつつある。そこで、今後それらに関する研究を促すため、関連する情報を整理し、英文総説を執筆した。

#### D. 考察

##### 1. 新型多剤耐性菌に関する基礎研究の強化の重要性

現在、カルバペネム耐性腸内細菌科(CRE)や多剤耐性アシネトバクターなどに加え、様々な新型多剤耐性菌が臨床現場のみならず畜水産現場で出現しつつある。しかし、新たに出現した新型多剤耐性菌については、その耐性機序も不明であり、その結果、それらを検出したり識別する検査法も未確立である場合が多く、その点がサーベイランスを実施したり対策を講じる上で支障となる。そこで、新規に出現しつつある多種多様な新型薬剤耐

性菌の克服の為、新しく出現しつつある多剤耐性機構に関する基礎的研究を、これまで以上に多面的に展開する必要がある、それを可能とする研究経費枠の確保が政策的に急務となっている。

##### 2. 新型多剤耐性菌に関する監視、検査・解析体制の強化の重要性

CRE や MDRA については、海外からの帰国患者が国内に持ち込む事例が多く、入院時の問診項目に、海外渡航歴を入れ、必要な場合に新型多剤耐性菌等を早期に検出できるように、適切に検査を実施する必要がある。しかし、一般的な医療機関の検査室では、CRE や MDRA などについては、未だ鑑別が困難な場合も多く、そのため、発見が遅れ、アウトブレイクの原因となることも多いのが実態である。つまり、これらの新型多剤耐性菌の判別には遺伝子の検出や遺伝型の解析等が必要であり、それには、特殊な技術や経験、知識を必要とする為である。したがって、新型の薬剤耐性菌に関する基礎研究で得られた成果を駆使し、一般的な検査室において日常的に実施可能な簡便かつ迅速、正確な検査法、解析法を構築することが急務となっている。また、医療機関の細菌検査室や地方衛生研究所はもとより、民間の検査センターなどにおいても、主要な新型多剤耐性菌の検査や解析が実施可能な体制を整備することがもてめられている。

##### 3. 薬剤耐性機構を不活化する新規物質の探索の重要性

病原菌は様々な薬剤耐性機構を獲得し臨床環境や畜水産環境で生き延びつつある。病原菌の増殖を抑制するために既に数々の抗菌薬が開発・実用化され広く使用されているが、新しい抗菌薬の開発は大きく滞っている。そこで、新規抗菌薬の開発の促進とともに、細菌が獲得したそれぞれの薬剤耐性機構を不活化する新規の物質を開発することで、これまでに実用化されてきた様々な抗菌薬の有用性を再び復活させることが期待できる。そのため、個々の薬剤耐性機構を標的とした新規の特異的阻害物質の開発も多剤耐性菌感染症を克服するための重要な手段となりうると思われる。

##### 4. ペニシリン低感受性 GBS の動向の監視

我々が世界で最初にその出現を確認したペニシリン低感受性 GBS(PRGBS)については、

米国からも報告がされるなど、国際的に認知されつつある。しかし、PRGBS はこれまでに新生児髄膜炎や妊婦の検査では確認されておらず、もっぱら高齢者の呼吸器系由来検体が多く、一部に褥創の膿や血液などからも分離されているのが実態である。その理由は、invasive な性状を保持した遺伝系統に属する株は、ペニシリン低感受性を獲得し難い等の特性を有するのかもしれない。事実、新生児の侵襲性感染症から分離される株の血清型としては III が多く、一方、PRGBS については血清型 VI の株が多い等、PRGBS はその他の侵襲性 GBS と遺伝的に異なるグループに属するというのがその背景にある可能性があり、その動勢を引き続き監視する必要がある。

#### 5. 多剤耐性 *Acinetobacter* の鑑別法

今回、我々が開発したマルチプレックス PCR をベースとした *Acinetobacter* 属菌の簡便同定法で、*A. baumannii* の場合は国際流行クローンの識別にも活用可能な解析法は、迅速に結果が得られその信頼性も高いことから、今後、国内外で広く普及することが期待される。

#### 6. 食肉由来 ESBL 産生株のヒトへの影響

近年、フルオロキノロンと広域セファロスポリンに耐性を獲得した大腸菌が医療環境のみならず市中からも高頻度で分離されるようになり、その原因として鶏肉などの食材に付着している薬剤耐性大腸菌の存在が指摘されている。たしかに、一部の ESBL 産生大腸菌は、同じ血清型や遺伝型の株が、食品とヒトの両方から分離されており、それらについては、食材を介するヒトへの伝播が起きていることを示す根拠となりうる。しかし、今回の調査では、鶏肉から分離される ESBL 産生大腸菌の血清型や遺伝型はヒト臨床検体から分離される株のそれらと必ずしも一致していなかった。したがって、両者の関連性をさらに厳密に評価するには、鶏肉由来株とヒト由来株の単なる血清型や遺伝型の比較のみならず、薬剤耐性遺伝子やそれを担う転移因子そのものに着目した詳しい比較解析が必要と考えられる。

#### E. 結 論

平成 24 年度から 26 年度にかけて、新型多剤耐性菌等の克服を想定して、それらが獲得した新しい薬剤耐性機構の解明とともに、そ

の成果に依拠した実用的な迅速、簡便な検査、解析法の構築等の研究を幅広く展開した。具体的な例としては、新型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (SMB-1) の精製と結晶化、X 線結晶構造解析などの基礎的研究課題から、新規のアミノ配糖体やホスホマイシン、およびカルバペネム耐性などに関与する新規の遺伝子の発見と解析、さらに、PRGBS やフルオロキノロン耐性肺炎桿菌、食品から分離される ESBL 産生大腸菌等の分子疫学解析などを行なった。それに加え、ホスホマイシンに高度耐性に関与する FosA3 などのグルタチオン転移酵素を産生する *E. coli* などの迅速、簡便識別法の開発や国際的に大きな問題となっている、多剤耐性アシネトバクターの菌種の迅速・同定、特に、感染制御上問題となる *A. baumannii* の国際流行クローンの迅速・簡便識別法の構築などを行なった。

#### F. 健康危険情報

1. 新型の薬剤耐性機構を獲得した様々な病原体が出現しており、学術的にも政策的にも更なる監視と対策の強化が必要となっている。
2. 海外より CRE や MDRA などの多剤耐性菌が常時侵入しているという現実を考慮し、サーベイランスの強化、検査・解析体制の強化、およびそれを可能とする薬剤耐性菌に関する基礎研究の活性化が緊急の課題となっている。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kimura K, Nagano N, Arakawa Y. Classification of group B streptococci with reduced  $\beta$ -lactam susceptibility (GBS-RBS) based on the amino acid substitutions in PBPs. J Antimicrob Chemother. 2015, in press.
- 2) Yamada R, Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Suzuki S, Jin W, Wachino J, Yamada K, Shibayama K, Arakawa Y. Comparative analysis of penicillin-susceptible and non-susceptible isolates in group B streptococci by multilocus sequence typing. Jpn J Infect Dis. 2015, in press.
- 3) Goto K, Kawamura K, Arakawa Y. Contribution of QnrA, plasmid-mediated quinolone resistance peptide, to survival of *Escherichia coli* exposed to lethal ciprofloxacin concentration. Jpn J Infect Dis. 2015, in press.
- 4) Jin W, Wachino JI, Kimura K, Yamada K, Arakawa Y. New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-Ia, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate. J

- Antimicrob Chemother. 2015, in press.
- 5) Ito R, Shindo Y, Kobayashi D, Ando M, Jin W, Wachino J, Yamada K, Kimura K, Yagi T, Hasegawa Y, Arakawa Y. Molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* associated with bacteremia among patients with pneumonia. J Clin Microbiol. 2015;53:879-86.
  - 6) Suzuki T, Kimura K, Suzuki H, Banno H, Jin W, Wachino J, Yamada K, Arakawa Y. Have group A streptococci with reduced penicillin susceptibility emerged? J Antimicrob Chemother. 2015, in press.
  - 7) Nagasaka Y, Kimura K, Yamada K, Wachino J, Jin W, Notake S, Yanagisawa H, Arakawa Y. Genetic profiles of fluoroquinolone-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* among cephalosporin-resistant *K. pneumoniae*. Microb Drug Resist. 2015, in press.
  - 8) Kitanaka H, Sasano MA, Yokoyama S, Suzuki M, Jin W, Inayoshi M, Hori M, Wachino J, Kimura K, Yamada K, Arakawa Y. Invasive infection caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter soli*, Japan. Emerg Infect Dis. 2014;20:1574-6.
  - 9) Wachino J, Kimura K, Yamada K, Jin W, Arakawa Y. Evaluation of disk potentiation test using kirby-bauer disks containing high-dosage fosfomycin and glucose-6-phosphate to detect production of glutathione S-transferase responsible for fosfomycin resistance. J Clin Microbiol. 2014;52:3827-8.
  - 10) Nakamura G, Wachino J, Sato N, Kimura K, Yamada K, Jin W, Shibayama K, Yagi T, Kawamura K, Arakawa Y. Practical agar-based disk potentiation test for detection of fosfomycin-nonsusceptible *Escherichia coli* clinical isolates producing glutathione S-transferases. J Clin Microbiol. 2015;52:3175-9.
  - 11) Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Shibayama K, Arakawa Y. Penicillin-susceptible group B streptococcal clinical isolates with reduced cephalosporin susceptibility. J Clin Microbiol. 2014;52:3406-10.
  - 12) Suzuki M, Hosoba E, Matsui M, Arakawa Y. New PCR-based open reading frame typing method for easy, rapid, and reliable identification of *Acinetobacter baumannii* international epidemic clones without performing multilocus sequence typing. J Clin Microbiol. 2014;52:2925-32.
  - 13) Kitanaka H, Wachino J, Jin W, Yokoyama S, Sasano MA, Hori M, Yamada K, Kimura K, Arakawa Y. Novel integron-mediated fosfomycin resistance gene *fosK*. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:4978-9.
  - 14) Banno H, Kimura K, Tanaka Y, Kitanaka H, Jin W, Wachino J, Yamada K, Shibayama K, Arakawa Y. Characterization of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility forming small non-Beta-hemolytic colonies on sheep blood agar plates. J Clin Microbiol. 2014;52:2169-71.
  - 15) Kimura K, Yanagisawa H, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y. Rapid and reliable loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Streptococcus agalactiae*. Jpn J Infect Dis. 2013;66:546-8.
  - 16) Hattori T, Kawamura K, Arakawa Y. Comparison of test methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacteria. Jpn J Infect Dis. 2013;66:512-8.
  - 17) Kawamura K, Goto K, Nakane K, Arakawa Y. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. Foodborne Pathog Dis. 2014;11:104-10.
  - 18) Sato N, Kawamura K, Nakane K, Wachino J, 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;19:477-82.
  - 19) Kimura K, Nishiyama Y, Shimizu S, Wachino J, Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Shibayama K, Arakawa Y. Screening for group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in clinical isolates obtained between 1977 and 2005. Jpn J Infect Dis. 2013;66:222-5.
  - 20) Kimura K, Matsubara K, Yamamoto G, Shibayama K, Arakawa Y. Active screening of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility and altered serotype distribution isolated from pregnant women in Kobe, Japan. Jpn J Infect Dis. 2013;66:158-60.
  - 21) Kimura K, Wachino J, Kurokawa H, Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Nagano N, Shibayama K, Arakawa Y. High cephalosporin resistance due to amino acid substitutions in PBP1A and PBP2X in a clinical isolate of group B Streptococcus. J Antimicrob Chemother. 2013;68:1533-6.
  - 22) Nagano N, Endoh Y, Nagano Y, Toyama M, Matsui M, Shibayama K, Arakawa Y. First report of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan from a patient returned from Southeast Asia. Jpn J Infect Dis. 2013;66:79-81.
  - 23) Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y. Ability of the VITEK(R) 2 system to detect group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS). J Antimicrob Chemother. 2013;68:1442-4.
  - 24) Kimura K, Nagano N, Nagano Y, Suzuki S, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y. High frequency of fluoroquinolone- and macrolide-resistant streptococci among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 2013;68:539-42.
  - 25) Wachino J, Yamaguchi Y, Mori S, Kurosaki H, Arakawa Y, Shibayama K. Structural insights into the subclass B3 metallo- $\beta$ -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor mercaptoacetate. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:101-9.

26) Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat*. 2012;15:133-48, Review.

27) Wachino J, Yamaguchi Y, Mori S, Yamagata Y, Arakawa Y, Shibayama K. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the subclass B3 metallo- $\beta$ -lactamase SMB-1 that confers carbapenem resistance. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2012;68:343-6.

28) Nagano N, Nagano Y, Toyama M, Kimura K, Tamura T, Shibayama K, Arakawa Y. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:849-56.

## 2. 学会発表

1) 木村幸司、長野則之、長野由紀子、鈴木里和、和知野純一、柴山恵吾、荒川宜親(2012)  
“ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (PRGBS) は多剤耐性化傾向がある”

第 49 回日本細菌学会中部支部総会 金沢 11 月 9 日-10 日

2) 木村幸司、長野則之、長野由紀子、外山雅美、荒川宜親(2012)

“連鎖球菌感染症にみられる新しい知見”

第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会、合同学会 東京 10 月 10-12 日 教育講演 7

3) 木村幸司、長野則之、長野由紀子、荒川宜親

“High Frequency of Fluoroquinolone- and Macrolide-resistant Streptococci among Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility”

28th International Congress of Chemotherapy and Infection (ICC), Yokohama, 2013 年 6 月 5 日-8 日. P119, Selected Poster Discussion PD02

(ポスター及び口頭発表)

4) 坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親(2013)

“非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌(PRGBS)の解析”

第 50 回日本細菌学会中部支部会総会 (口頭発表) 蒲郡 10 月 18 日 19 日

5) 木村幸司、長野則之、長野由紀子、外山雅美、荒川宜親(2013)

“ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌 (PRGBS) に関する最新知見”

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 横浜 6 月 5 日—6 日 シンポジウム 29 耐性菌を科学する：グラム陽性耐性菌に関する知見のアップデート

(指定、口頭発表)

6) 坂野弘嗣、木村幸司、田中洋輔、北仲博光、金万春、和知野純一、山田景子、柴山恵吾、荒川宜親(2013)

“非溶血性多剤耐性ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌(PRGBS)の解析”

第 42 回薬剤耐性菌研究会 (口頭発表) 熱海 10 月 17 日 18 日

7) 長野則之、長野由紀子、外山雅美、木村幸司、柴山恵吾、荒川宜親(2015)

“ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌株の血清型の変遷とその分子生物学的特性”

第 26 回日本臨床微生物学会総会学術集会 (口頭発表) 東京 1 月 31 日、2 月 1 日 O-005

8) 和知野純一、木村幸司、山田景子、柴山恵吾、八木哲也、川村久美子、荒川宜親(2015)

“ESBL 産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易識別法の開発”

第 26 回日本臨床微生物学会総会学術集会 (口頭発表) 東京 1 月 31 日、2 月 1 日 O-162

9) 鈴木健史、木村幸司、鈴木寛、坂野弘嗣、金万春、和知野純一、山田景子、荒川宜親(2014)

“ $\beta$ -ラクタム系抗菌薬低感受性 A 群  $\beta$  溶血性レンサ球菌は国内で出現したのか?”

第 43 回薬剤耐性菌研究会 (口頭発表) 加賀市 10 月 31 日-11 月 1 日

10) 中村元気、和知野純一、佐藤夏巳、木村幸司、山田景子、金万春、柴山恵吾、八木哲也、川村久美子、荒川宜親(2014)

“ESBL 産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易検出法の開発” 第 43 回薬剤耐性菌研究会 (口頭発表) 加賀市 10 月 31 日-11 月 1 日

11) 山田景子、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 (2014)

“ニワトリ IgY 抗体を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA の検出”

第 51 回日本細菌学会中部支部会 (口頭発表) 金沢 10 月 17 日 18 日

12) 伊藤亮太、進藤有一郎、小林大介、安藤昌彦、金万春、和知野純一、山田景子、木村



幸司、八木哲也、長谷川好規、荒川宜親(2014)

“肺炎患者より検出された *Klebsiella pneumoniae* の分子疫学的解析”

第 51 回日本細菌学会中部支部会(口頭発表)

金沢 10月17日18日

13) 金万春、和知野純一、山田景子、木村幸司、荒川宜親(2014)

“*Serratia marcescens* より発見された新規プラスミド媒介性アミノ配糖体アセチル化酵素の解析”

第 51 回日本細菌学会中部支部会(口頭発表)

金沢 10月17日18日

14) 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

15) 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

16) 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

17) 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

以下、長野則之他

18) 第 87 回日本感染症学会・第 61 回日本化学療法学会

“本報で初めて確認された OXA-48-カルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* 及び *Escherichia coli* の解析”

19) 第 42 回薬剤耐性菌研究会

“本報で初めて確認された OXA-48-カルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* 及び *Escherichia coli* の分子学的特性”

20) 第 25 回日本臨床微生物学会

“国内で初めて確認された OXA-48-カルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* 及び *Escherichia coli* の分子学的特性”

30) 第 59 回日本化学療法学会総会

“同一施設で検出された多剤耐性・ペニシリン低感受性 B 群連鎖球菌の分子学的解析”

31) 第 40 回薬剤耐性菌研究会

“Clonal complex 1 の ST-458 に属する多剤耐性・ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌の院内伝播”

32) 第 23 回日本臨床微生物学会総会

“同一施設で検出された多剤耐性・ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌の分子学的特性”

33) 第 86 回日本感染症学会総会

“多剤耐性・ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌(ST-458)の出現と院内伝播”

34) 第 42 回薬剤耐性菌研究会

“NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼ, OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の出現”

35) 第 25 回日本臨床微生物学会

“NDM-1 メタロ-β-ラクタマーゼ, OXA-181 カルバペネマーゼ等同時産生の広範囲抗菌薬耐性 *Klebsiella pneumoniae* の出現”

以下、山田景子他

36) 山田景子、白井義憲、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 「黄色ブドウ球菌の抗 MRSA 薬の感受性調査」第 41 回薬剤耐性菌研究会、抄録集 41 頁、平成 24 年

37) 山田景子、白井義憲、金万春、岡本陽、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 「抗 MRSA 薬耐性黄色ブドウ球菌の調査とその疫学」日本細菌学会中部支部総会、予稿集 41 頁、平成 24 年

38) 山田景子、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 「抗 MRSA 薬耐性黄色ブドウ球菌の調査とその疫学」日本臨床微生物学雑誌 Vol.22, 173 頁、平成 24 年

39) 山田景子、金万春、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 「黄色ブドウ球菌のダプトマイシン感受性」第 42 回薬剤耐性菌研究会、静岡県、平成 25 年

40) 山田景子、和知野純一、木村幸司、荒川宜親 「Arbekacin resistance of *Staphylococcus aureus*」第 87 回日本細菌学会総会、愛知県、平成 26 年

41) 畑中公基、山田景子、武田 明、木戸裕

勝 佐川美恵、吉川誠一、小野伸高、荒川宜親  
「骨髓炎患者から検出された Daptomycin 非感受性 *Staphylococcus capitis* subspecies *urealyticus* 株の検討」第 26 回日本臨床微生物学会総会学術集会、東京、平成 27 年

42) 川辺佳苗、山田景子、金万春、和知野純一、木村幸司、荒川宜親「Development of a rapid detection system of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci」第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、平成 27 年

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

1) アシネトバクター属菌の遺伝型タイピング法およびこれに用いるプライマーセット (特願2014-61751)

### 2. 特許取得

1) B群連鎖球菌を検出するためのプライマーセット及びその利用 荒川宜親、木村幸司、柳沢英二 登録日 平成24年12月14日 特許番号 特許第5153726号

2) ペニシリン耐性B群連鎖球菌 (Group B streptococcus) を識別する方法及び識別用キット 木村幸司、黒川博史、荒川宜親 登録日 平成24年3月30日 特許番号 特許第4956721号



## 別紙

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）  
平成 24-26 年度 分担研究総合報告書

### MDRP、MRSA 等の伝播様式と蔓延防止に関する研究

研究分担者	飯沼由嗣	(金沢医科大学・臨床感染症学・教授)
研究協力者	鈴木匡弘	(愛知県衛生研究所・細菌研究室・主任研究員)
研究協力者	馬場尚志	(金沢医科大学・臨床感染症学・准教授)

#### 研究要旨

本研究では、MDRP 等の薬剤耐性菌の感染伝播様式の解析のため、再現性が高く実施が比較的容易な分子疫学解析法の開発及び評価を目的とした。菌株毎に保有状態の異なる open reading frame (ORF) の臨床分離株における保有パターンに関する研究を行い、緑膿菌においては ORF の保有パターンが菌株毎に異なることを発見し、ORF 保有パターンにもとづく菌株タイピング開発の可能性が示された。また、次世代シーケンサーを利用したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分子疫学解析の可能性を検討した。一塩基多型 (SNP) による系統樹解析によって、集団感染株を識別可能であることが示された。

#### A. 研究目的

本研究では、施設内あるいは施設を超える院内感染伝播や予後不良に関わる MDRP や MRSA の菌株 (danger strain) を遺伝学的に解析し、その簡易同定法の開発を目指す。新たなタイピング法としての質量分析装置 (MALDI-TOF MS) による MRSA および緑膿菌の解析を試みた。また、緑膿菌の PCR を用いたタイピング法 (PCR-based ORF typing (POT) 法) の MLST や PFGE 法との比較検討を行った。MRSA に関しては、地域サーベイランスによる小児流行 MRSA クローンの同定解析、さらには次世代シーケンサーを用いた解析を行い、一塩基多型 (SNP) を利用した系統樹解析による分子疫学解析の可能性を検討した。

#### B. 研究方法

1) MALDI-TOF (ブルカー社) を用いた MRSA および緑膿菌の質量分析解析

1. MRSA POT 法で同一パターンを示し、施設内伝播が疑われる MRSA 臨床分離株を用いて、MALDI-TOF による質量分析解析を行った。

2. POT 法にて遺伝子型の判明している緑膿菌保存株について同様に質量分析解析を行った。

3. 通常と同定に加えて、波形パターンの解析を専用ソフトウェアである ClinPro Tools を用いて行った。

2) PCR-based ORF typing 法による緑膿菌の解析

1. 1 医療機関にて 7 ヶ月間に連続して分離された緑膿菌 214 株を POT 法で解析し、緑膿菌の遺伝子型の多様性を評価した。

2. 臨床分離株および ATCC 標準株の合計 179 株を MLST 解析し、POT 法による結果と比較した。

3. 臨床分離株 183 株 (集団感染 2 事例を含む) を PFGE 解析し、POT 法と比較した。

3) 小児由来 CA (市中感染) MRSA の解析

北陸地区の地域サーベイランスにより、小児 CA-MRSA に流行クローンの存在が示唆されたため、10 才未満の小児由来 CA-MRSA 株 62 株について解析をすすめた。

4) 全ゲノムシーケンスによるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の解析

1. 使用菌株 (表 3) 使用した菌株はすべて Cica Geneus Staph POT kit (関東化学) を用いて遺伝子型を決定し、全ゲノム解析株選別の参考とした。

事例 1: NY/Japan クローンの臨床分離 MRSA 34 株を用いた。内訳としては集団感染由来株 (14 株) および散発事例から分離された菌株 (20 株)。

事例 2: ST1、SCC<sub>mec</sub> type IV の臨床分離 MRSA 15 株。内訳としては集団感染由来株 (8 株) および POT 型から散発事例と判断された 7 株。

事例 3: 市中感染型 MRSA として ST121、SCC<sub>mec</sub> type V の株を 12 株および対照として ST121 のメ

チシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) 10 株を用いた。MSSA のうち POT 型 6-18-81 は 70-18-81 と近縁関係が期待される株である。

2. MiSeq シークエンサーを用いて解析した。得られたデータは Abyss (Genome Res. 19:1117-1123, 2009) にて contig を作成し、MUMmer (Genome Biology, 5:R12, 2004) を用いて single nucleotide polymorphisms (SNPs) を抽出した。Genomic islands および SNP 集積が見られた領域を除いたコアゲノムから得られた SNP を用いて、RAxML (Bioinformatics, btu033, 2014) で系統樹解析し、MEGA6 (Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739, 2011) を用いて系統樹の描画を行った。また得られた contig は CONTIGuator (Source Code for Biology and Medicine 6:11, 2011) を用いて Mu50 株全ゲノムデータにマッピングを行った。また参考のため、POT 型 70-18-81 のデータは Mu50 にマッピング、整列した contig に POT 型 6-18-81 を再マッピングし、比較した。

倫理面への配慮 臨床データを不可逆的に切り離した菌株のみを扱う研究であり、倫理的な問題は発生しない。

### C. 研究結果

1) MALDI-TOF (ブルカー社) を用いた MRSA および緑膿菌の質量分析解析

1. POT 型で分類される 6 グループ (それぞれのグループに 2~10 株の同一 POT 型の MRSA 菌株あり) の質量分析波形パターンを解析した。それぞれのグループ間でのパターンはよく保存されており、同一遺伝子型の MRSA は同一質量分析パターンを示す傾向がみられた。一方で、異なる POT 型の株においても多くの波形が類似しており、遺伝子型毎の特徴的な波形を見いだすことは容易ではなかった (図 1)。

2. 緑膿菌については、菌種同定については良好な判定が可能であったが、同一の遺伝子型の菌においても多様性が高く、質量分析による株レベルでの判定は困難であった。

2) PCR-based ORF typing 法による緑膿菌の解析

1. 7 ヶ月間に分離された緑膿菌は 132 の POT 型に分類された。同一 POT 型となった株数は POT

型 823-0 が 15 株と最も多く、次いで 646-48 の 9 株、28-16 および 634-0 の 6 株と続いた。他の 178 株は 128 の POT 型に分けられた。同一 POT 型株が多く見られた 823-0 と 646-0 については病院内の水平伝播が強く疑われた。

2. MLST 解析との比較から POT 型の最初の数値 (POT1 値) と MLST 解析による clonal complex (CC) 型との相関が見られた。52 種類の POT1 値は CC 型との間に 1 : 1 の関係が見られた (表 1)。一方 20 種類の POT1 値には複数の CC 型が含まれた (表 2)。

3. PFGE 解析に用いた 183 株は POT 法では 76 遺伝子型に分けられた。POT 法による菌株識別能力は PFGE 法で homology 80% を同一とした場合 (68 遺伝子型) と同等かやや上回っていた。集団感染由来株はおおのこの事例内で同一 POT 型となった (図 2)。一方 PFGE 解析では同一集団感染由来株のホモロジーは 78.99%~93.97% となった。

3) 小児由来 CA (市中感染) MRSA の解析

62 株の病原因子解析では、PVL および ACME 保有株が各 1 株 (1.6%) ずつ、ETA 保有株が 24 株 (38.7%)、ETB 保有株が 3 株 (4.8%)、TSST-1 保有株が 18 株 (29.0%) となった。

POT 解析では、POT1=70 (推定 CC121) が 30 株 (48.4%) と最も多く、次に POT1=106 (推定 CC8) が 24 株 (38.7%)、POT1=65 (推定 CC89) および 93 (推定 CC5) がそれぞれ 2 株 (3.2%) ずつとなった。

地域において集積がみられた POT 型、病原因子の組合せは、POT 型 70-18-81, ETA 陽性が 23 株 (37.1%) と最も多かった。次に POT 型 106-9-80、TSST-1 陽性が 7 株 (11.3%) となった。POT1=106, TSST-1 陽性株は全 13 株となった (表 4)

4) 全ゲノムシークエンスによるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の解析

事例 1 : SNP による系統樹解析の結果、集団感染事例由来株はきわめて近縁な関係にあり、同一集団事例内における SNP 数は 4-19 個であった。また、すべての POT 型株において、POT 型が同一の分離株は近縁関係にあり、クラスタを形成していた (図 4)。しかし、同一 POT 型株でも散発事例由来株間の SNP 数は 21-67 個と多かった。さらに

Mu50 株に contig をマッピングした結果、Mu50 株と今回解析した NY/Japan クローンとの主な差異は溶原ファージと pathogenicity island であった (図 5)。

事例 2 : SNP による系統樹解析の結果、集団感染事例由来株は近縁な関係にあり、同一集団事例内における SNP 数は 14-50 個であった。ST1 のクローンは POT 型とデンドログラムの間に明確な相関関係は見られなかった (図 6)。

事例 3 : SNP による系統樹解析によって ST121 の MRSA と MSSA は異なるクラスタに分かれたが (図 7)、6-18-81 の MSSA は MRSA と最も近い位置に来た。また、MRSA 70-18-81 と 6-18-81 の MSSA 間の主な違いは SCCmec の有無だけであった (図 8)。

#### D. 考察

MALDI-TOF による質量分析解析結果から、MRSA については専用ソフトを用いる事により、疫学的な解析が可能となる可能性が示された。一方で、本研究課題の目的である danger strain の判定については、さらなる菌株解析が必要であると考えられた。緑膿菌については、解析時の菌株の調整方法など、波形データの安定性を高める処理が必要であると考えられた。

緑膿菌 POT 法の菌株識別能力はおおむね PFGE パターンのデンドログラム解析による homology 80%程度に相当した。これは MLST 解析の識別能力とほぼ一致する菌株識別能力と考えられるが、CC 型との相関を想定して設計した POT1 値が主な菌株識別能を担っていることから妥当な結果と考えられる。臨床分離される株の POT 型の多様性は非常に高いことも確認され、院内感染疑い時の分子疫学解析法として十分な菌株識別能力があると考えられた。

全ゲノムデータを元にした SNP による系統樹解析によって、高精度の分子疫学解析が可能であった。その一方、クローンによって SNP の入り方に差があることが示唆され、集団感染事例を解析する際、同一集団と判定するための SNP 数の閾値を特定の値に設定することは困難であると考えられた。クローン間で SNP 数に差が出た原因としては、コアゲノムの選択による変動が含まれた可能性がある。

全ゲノム解析による分子疫学解析は未だ報告

事例が少ないため、データを蓄積し、集団感染と判断するための判断基準を作成する必要があると考えられた。

ST121 の市中感染型 MRSA は元々日本に存在した MSSA に SCCmec が挿入されて、成立したクローンと考えられる。現在では小児から分離される、伝染性膿痂疹関連 MRSA としては主要なクローンとなっており、メチシリン耐性獲得が同クローンの拡散に貢献した可能性が示唆された。

#### E. 結論

質量分析により、MRSA の菌株識別の可能性が示唆された。緑膿菌 POT 法の菌株識別能力はおおむね MLST 解析程度と考えられた。臨床分離株の多様性が非常に高いことから、集団感染の判定に必要な十分な菌株識別能力が備わっていると結論された。全ゲノム配列を利用した SNP による系統樹解析によって、高精度に分子疫学解析できる可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsushima A, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura Y, Shirano M, Nagao M, Ito Y, Iinuma Y, Shimizu T, Fujita N, Ichiyama S. Regional spread and control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Kyoto, Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 31(6):1095-100, 2012.
- 2) 松浦香里、飯沼由嗣、他 多剤耐性緑膿菌の検出におけるクロモアガー-MDRP スクリーン培地の基礎検討 医学検査. 62:64-68, 2014.
- 3) 飯沼由嗣 医療関連感染と制御 2 医療関連感染で問題となる病原微生物・感染性因子の制御 (1) 細菌 防菌防黴 42:517-515, 2014.

##### 2. 学会発表

- 1) 鈴木匡弘、飯沼由嗣、他市中獲得型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 USA300 の市販抗菌薬

- 軟膏耐性、第 86 回日本感染症学会（2012 年 4 月）長崎市
- 2) 鈴木匡弘、他、緑膿菌集団感染事例の緑膿菌 POT 法および PFGE 法による分子疫学解析、第 61 回日本感染症学会東日本地方会（2012 年 10 月）東京都
  - 3) 鈴木匡弘、飯沼由嗣、他 緑膿菌のデジタル分子疫学法の開発、第 41 回薬剤耐性菌研究会（2012 年 10 月）岐阜県下呂市
  - 4) Baba H, Suzuki M, Iinuma Y, Investigation of the Clonality of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Ishikawa Prefecture of Japan by Using Phage-Derived Open Reading Frames Typing. IDWeek 2012, San Diego, Oct 2012.
  - 5) 馬場尚志、飯沼由嗣 PCR-based open reading frames typing 法によるカルバペネム耐性緑膿菌の疫学的解析、第 59 回日本臨床検査医学会学術集会（2012 年 11 月）、京都市
  - 5) 鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 緑膿菌の PCR-based ORF typing (POT) 法の開発と性能評価、第 24 回日本臨床微生物学会（2013 年 2 月）横浜市
  - 6) 細羽恵理子、鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 MLST 解析との比較による緑膿菌用 PCR-based ORF typing (POT) 法の評価、第 24 回日本臨床微生物学会（2013 年 2 月）横浜市
  - 7) 鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 緑膿菌の PCR-based ORF typing、法の開発、第 47 回緑膿菌感染症研究会（2013 年 2 月）札幌市
  - 8) 鈴木匡弘、他 ORF 検出パターンによる緑膿菌の迅速簡易分子疫学解析法の開発、第 86 回日本細菌学会（2013 年 3 月）千葉市
  - 9) 鈴木匡弘、飯沼由嗣、他 臨床分離薬剤耐性緑膿菌の POT 法による分子疫学解析、第 87 回日本感染症学会総会（2013 年 6 月）横浜市
  - 10) Iinuma Y, Baba H, et al. Multicenter survey of the antibiotic susceptibility of anaerobic Gram-negative bacilli in Japan. ID WEEK (Oct, 2013) San Francisco, USA
  - 11) Baba H, Iinuma Y, et al. Antimicrobial resistance in Hokuriku District, Possible spreading of exfoliative toxin A-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan as the dominant clone of community-associated MRSA among children. ID WEEK (Oct, 2013) San Francisco, USA
  - 12) 金谷和美、馬場尚志、飯沼由嗣、他 北陸地区における嫌気性グラム陰性桿菌に関するサーベイランス、第 25 回日本臨床微生物学会総会（2014 年 1 月）、名古屋市
  - 13) 新川晶子、馬場尚志、飯沼由嗣、他 北陸地区における黄色ブドウ球菌及び肺炎球菌の薬剤耐性について、第 25 回日本臨床微生物学会総会（2014 年 1 月）、名古屋市
  - 14) 坂上有貴子、馬場尚志、飯沼由嗣、他 北陸地区における ESBL 産生腸内細菌および薬剤耐性緑膿菌の検出状況、第 25 回日本臨床微生物学会総会（2014 年 1 月）、名古屋市
  - 15) 早川恭江、鈴木匡弘、他、耐性緑膿菌に対する分子疫学解析、第 29 回日本環境感染学会総会（2014 年 2 月）東京都
  - 16) 鈴木匡弘、他、薬剤耐性菌の分子疫学解析法開発、第 87 回日本細菌学会総会（2014 年 3 月）東京都
  - 17) 鈴木匡弘、他 薬剤耐性菌の分子疫学解析法開発、第 87 回日本細菌学会（2014 年 3 月）東京都
  - 18) 飯沼由嗣、馬場尚志、他 北陸地区における嫌気性グラム陰性桿菌の感受性サーベイランス。第 88 回日本感染症学会学術講演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会（2014 年 6 月）福岡
  - 19) 馬場尚志、飯沼由嗣、他 北陸地区におけるカルバペネム耐性緑膿菌に関する疫学的検討。第 88 回日本感染症学会学術講演会 第 62 回日本化学療法学会総会 合同学会（2014 年 6 月）福岡
  - 20) Suzuki M, Iinuma Y, et al. Development of a PCR-based molecular epidemiology method for *Pseudomonas aeruginosa*. IUMS2014 (July 2014) Montreal, Canada

- 21) 鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 次世代シーケンサーによる MRSA 集団感染事例の解析、第 43 回薬剤耐性菌研究会（2014 年 10 月）加賀市
- 22) 鈴木匡弘、馬場尚志、飯沼由嗣、他 次世代シーケンサーによる MRSA 集団感染事例の解析、第 26 回日本臨床微生物学会（2015 年 1 月）東京都

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得 特願 2012-10593 緑膿菌の遺伝子型別分類法およびこれに用いるプライマーセット
2. 実用新案登録 なし
3. その他

図1 MALDI-TOF を用いた MRSA の波形分析結果

Group	株数	POT 型
1	2	65-152-80
2	4	70-152-80
3	10	93-201-103
4	5	93-219-111
5	10	93-223-117
6	4	106-9-80

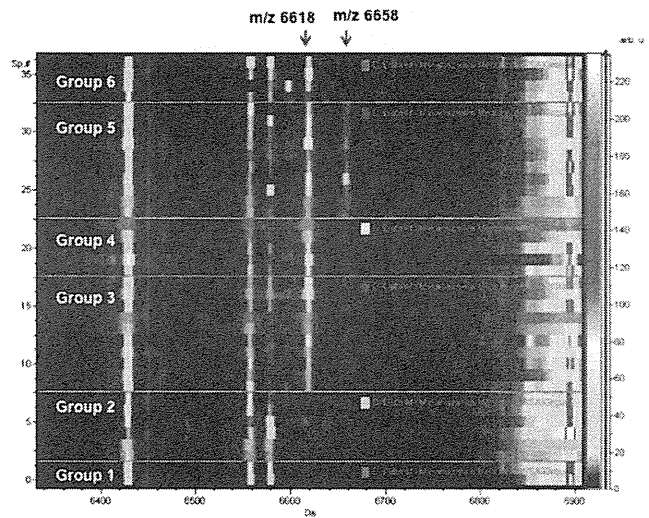


表1 POT1 値と ST 型 (CC 型) が 1:1 で対応した組み合わせ

POT1	ST	株数	POT1	ST	株数	POT1	ST	株数
14	new	1	207	CC235	14	574	CC360	2
44	CC1239	2	249	ST164	5	604	CC687	1
45	new	1	278	new	1	622	ST447	1
46	CC241	2	287	CC875	1	634	CC242	5
56	ST966	1	302	CC406	1	635	new	1
70	CC859	1	307	new	1	636	CC155	6
74	new	1	311	ST209	1	646	CC3657	8
92	new	1	314	CC260	2	656	ST532	2
105	ST252	2	316	ST1129	2	706	ST319	3
108	ST654	4	318	ST245	2	822	CC569	1
118	CC879	1	319	ST270	1	823	ST274	6
123	CC464	1	392	ST313	3	879	ST4	1
126	ST439	1	398	ST971	1	886	new	1
136	ST1051	1	410	ST1076	6	887	CC381	2
199	ST620	1	450	ST1203	1	894	ST132	2
201	ST829	1	458	ST1027	1	974	CC446	3
203	ST308	5	467	ST1197	1			
206	new	1	554	ST233	5			

表2 一つの POT1 値に複数の ST 型 (CC 型) が見られた組み合わせ

POT1	POT2	ST	株数	POT1	POT2	ST	株数
28	16	ST186	2	382	4	CC852	1
	0	CC992	1		0	ST549	1
60	0	ST262	2	383	52	CC244	1
	0	new	1		44		1
62	0	ST291	1	572	0/48/58	CC282	3
	16	ST412	1		76	ST983	1
	0	new	1		0	new	1
63	0	ST272	1	639	8	new	1
	4	new	1		0	ST1284	1
109	0	new	1	643	0	new	1
	4	new	1		2/16	CC179	4
122	0	ST859	1	573	16	new	1
	0/8	new	3		0	1	
124	0	ST389	1	637	0	ST882	1
	0	ST641	1		0	ST1033	1
	0	ST988	1		52	new	1
	0	new	1		380	0	1
125	0	ST635	1	575	16	CC17	3
	0	CC1058	2		45	ST1285	2
335	16	ST606	1	830	0	ST645	2
367	16		1		15	ST254	1
		0	CC1045	1			



図2 PFGE パターンのデンドログラム解析(抜粋)

集団感染事例は同一 POT 型となった (2008N625 株は集団事例由来株ではない)。POT 法はおおむね PFGE パターンのホモロジー80%程度の菌株識別能力であった。

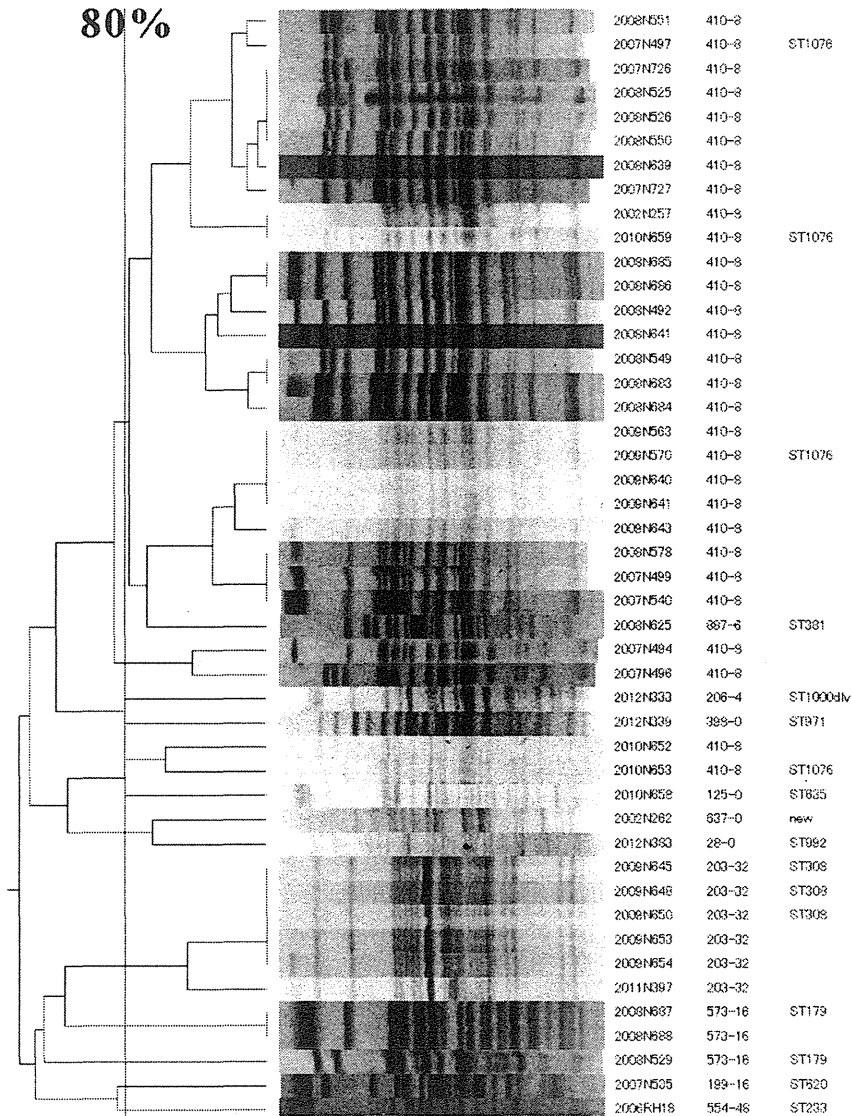


表3 全ゲノム解析に用いた菌株

	POT 型	株数	備考
事例 1	93-190-127	8	集団感染事例
	93-190-127	6	集団感染事例
	93-223-117	6	散発事例
	93-201-103	6	散発事例
	93-136-103	1	散発事例
	93-254-99	1	散発事例
	93-138-98	1	散発事例
	93-136-2	1	散発事例
	93-191-103	1	散発事例
	93-209-25	1	散発事例
	93-201-35	1	散発事例
93-145-56	1	散発事例	
事例 2	106-183-32	5	集団感染事例
	106-183-33	3	集団感染事例
	106-183-32	2	散発事例
	106-183-37	2	散発事例
	106-183-41	2	散発事例
	106-183-45	1	散発事例
事例 3	70-18-81	7	MRSA、ETA 産生株、散発
	70-18-1	5	MRSA、ETA 非産生株、散発
	6-18-81	1	MSSA、ETA 産生株、散発
	多様	4	MSSA、ETA 産生株、散発
	多様	5	MSSA、ETA 非産生株、散発

表4 北陸地区サーベイランスによって集積がみられた POT 型を示す CA-MASA

POT 型 70-18-81 23 株

POT 型 106-9-80 7 株

ETA: exfoliative toxin A, TSST-1: toxic shock syndrome toxin-1

Hospital	Age	POT	ETA
A (n=1)	0	70-18-81	+
B (n=1)	0		
C (n=4)	2~5		
D (n=2)	4~5		
E (n=2)	2~8		
F (n=2)	2~5		
G (n=1)	4		
H (n=7)	0~9		
I (n=2)	3~5		
J (n=1)	9		

Hospital (各 1 株)	Age	POT	TSST-1
B, F, H	0~2	106-9-2	+
A, B, E, F, I, K, L	0~4	106-9-80	
B	0	106-9-80	
C, C, M	0~5	106-11-64	+
C	4	106-11-72	

図4 NY/Japan クローンの全ゲノム SNP による系統樹解析

事例1 (NY/Japanクローン)

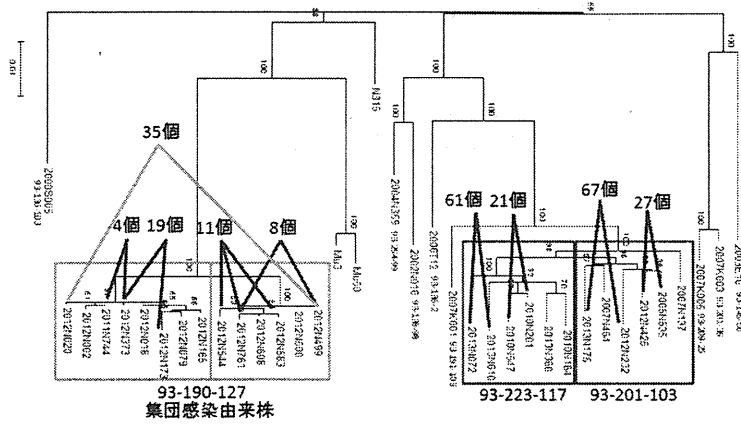
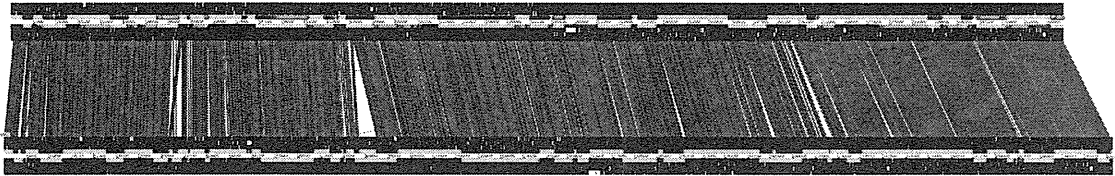


図5 NY/Japan クローン株データの Mu50 株データへのマッピング

POT 型 93-201-103 (2005N535 株)



Mu50

図6 ST1 SCCmec type IV の全ゲノム SNP による系統樹解析

事例2 (ST1 SCCmec type IV)

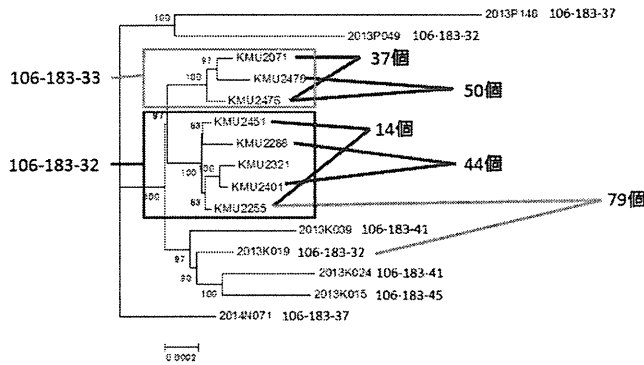


図7 ST121 市中感染クローンの全ゲノム SNP による系統樹解析

### 事例3 (ST121 MRSA、MSSA)

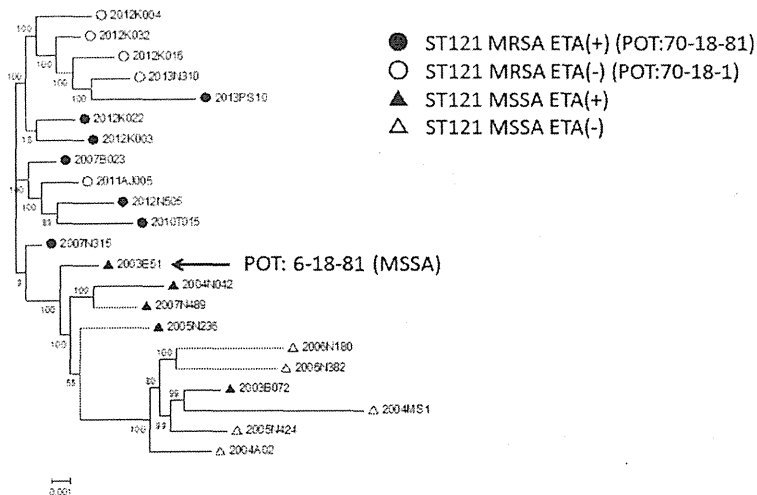
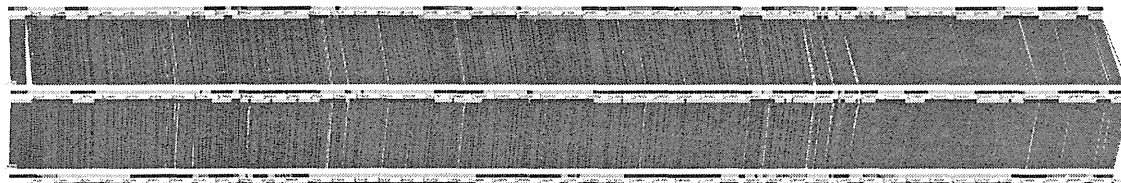


図8 ST121 市中感染型 MRSA と ST121 MSSA の比較

POT 型 6-18-81 MSSA



POT 型 70-18-81 MRSA

## 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 日本国内小児患者由来肺炎球菌の $\beta$ -ラクタム剤抗菌薬 に対する低感受性化に関する研究

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所細菌第一部 部長

#### 研究要旨

この研究では我々は日本国内の小児侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）由来肺炎球菌 421 株の血清型別、薬剤感受性およびシークエンスタイピングを行った。髄膜炎症例 55 例のうち、ペニシリン G 耐性肺炎球菌（PRSP; MIC  $\geq 0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）が分離されたのは 22 例（40.0%）、セフトキシム非感受性菌（MIC  $\geq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）が 8 例（14.5%）であった。一方、髄膜炎以外の IPD 由来肺炎球菌のうち、PRSP（MIC  $\geq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）がなかった。セフトキシム非感受性菌（MIC  $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）が 13 例（3.6%）であった。メロペネム耐性菌（MIC  $\geq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）は 7 症例（1.7%）より分離された。これらの  $\beta$ -ラクタム剤抗菌薬に低感受性を示す肺炎球菌のうち、Sequence type (ST) 320 型 19A 肺炎球菌および 15A 型が多くみられた。我々はペニシリン G とメロペネム耐性 IPD 由来肺炎球菌の解析を行い、耐（低感受）性のメカニズムを探索した結果を報告する。加えて、淋菌の薬剤感受性試験に関して若干の検討を行ったので報告する。

#### A. 研究目的

7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV7）は、日本には 2010 年 2 月に導入され、2013 年 4 月 1 日から定期接種の対象となり、さらに 2013 年 11 月 1 日からは PCV7 に新たに 6 種類の血清型ポリサッカライドを加えた 13 価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）に定期接種用ワクチンは変更された。肺炎球菌コンジュゲートワクチンの定期接種化による IPD の罹患率の減少がみられた。それに加えて、化学療法剤に対する低感受性/耐性肺炎球菌の分離の低下も期待されている。本分担研究は、研究期間中、日本国内の小児侵襲性感染症（IPD）から分離された肺炎球菌の薬剤感受性試験を行い、抗菌薬に対する感受性を調べた。さらに、 $\beta$ -ラクタム剤耐性のメカニズムを解明する解析を試みた。

#### B. 研究方法

##### 1: 小児 IPD 症例由来肺炎球菌

2012-2014 の 3 年間に、日本国内の小児 IPD から分離された肺炎球菌 株を対象とした。血液寒天培地にて  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で一晩培養した肺炎球菌を用いて解析を行った。

##### 2: 血清型別

肺炎球菌の血清型は Statens Serum Institut 製血清を用いて、莢膜膨潤法により決定した。

##### 3: 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は微量液体希釈法によって行った。薬剤感受性試験の結果は 2008 年から使われた CLSI の基準によって判別を行った。すなわち、髄膜炎由来肺炎球菌のペニシリン G（PCG）の MIC が  $\leq 0.06$