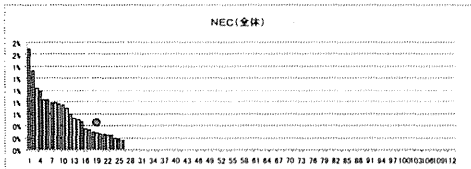


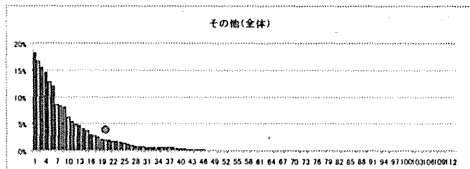
NEC



該当番号:19

	入院 患者数	感染症 発症数	負傷数 発症数	全員の 発症率	負傷数発症率と 全員の発症率の比較
75kg以下	25	0	0	0.0%	0.0%
751~ 1,000g	27	1	3	3.7%	1.8%
1,001~ 1,500g	48	0	0	0.0%	0.3%
1,501~ 2,000g	136	0	0	0.0%	0.4%
2,001g以上	115	0	0	0.0%	0.3%
全体	351	1	3	0.3%	0.7%

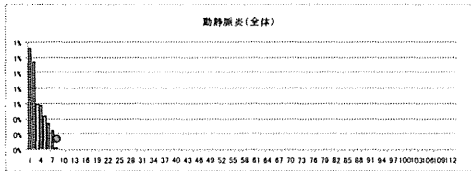
その他



該当番号:20

	入院 患者数	感染症 発症数	負傷数 発症数	全員の 発症率	負傷数発症率と 全員の発症率の比較
75kg以下	25	3	12	12.0%	4.2%
751~ 1,000g	27	1	4	3.7%	4.1%
1,001~ 1,500g	48	1	2	2.1%	2.1%
1,501~ 2,000g	136	1	0	0.7%	0.8%
2,001g以上	115	1	2	0.9%	1.2%
全体	351	7	18	2.0%	1.2%

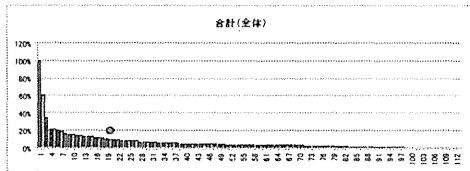
動静脈炎



該当番号:21

	入院 患者数	感染症 発症数	負傷数 発症数	全員の 発症率	負傷数発症率と 全員の発症率の比較
75kg以下	25	0	0	0.0%	0.8%
751~ 1,000g	27	0	0	0.0%	0.2%
1,001~ 1,500g	48	0	0	0.0%	0.3%
1,501~ 2,000g	136	0	0	0.0%	0.0%
2,001g以上	115	0	0	0.0%	0.4%
全体	351	0	0	0.0%	0.1%

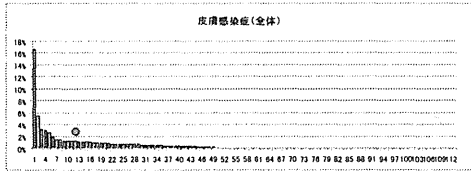
合計



該当番号:22

	入院 患者数	感染症 発症数	負傷数 発症数	全員の 発症率	負傷数発症率と 全員の発症率の比較
75kg以下	25	10	40	40.0%	42.9%
751~ 1,000g	27	8	28	29.6%	20.1%
1,001~ 1,500g	48	1	2	2.1%	8.0%
1,501~ 2,000g	136	8	5	5.9%	2.3%
2,001g以上	115	6	5	5.2%	3.8%
全体	351	33	75	9.4%	4.7%

皮膚感染症

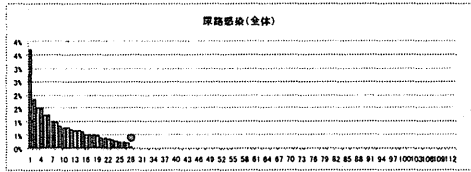


該当番号:23

	入院 患者数	感染症 発症数	負傷数 発症数	全員の 発症率	負傷数発症率と 全員の発症率の比較
75kg以下	25	2	8	8.0%	2.2%
751~ 1,000g	27	2	7	7.4%	0.7%
1,001~ 1,500g	48	0	0	0.0%	0.3%
1,501~ 2,000g	136	0	0	0.0%	0.2%
2,001g以上	115	0	0	0.0%	0.5%
全体	351	4	15	1.1%	0.4%

以上のような形で、モニタリングデータを報告していただいた各施設に、送付する。
(基本的に、解説はなし)

尿路感染

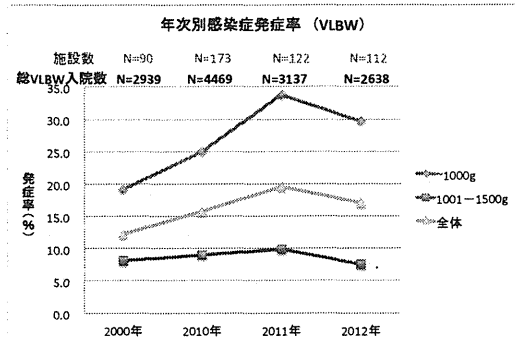


該当番号:24

	入院 患者数	感染症 発症数	負傷数 発症数	全員の 発症率	負傷数発症率と 全員の発症率の比較
75kg以下	25	0	0	0.0%	0.8%
751~ 1,000g	27	0	0	0.0%	0.8%
1,001~ 1,500g	48	0	0	0.0%	0.2%
1,501~ 2,000g	136	0	0	0.0%	0.2%
2,001g以上	115	0	0	0.0%	0.1%
全体	351	0	0	0.0%	0.2%

図1に年別のアンケート回答施設数と各年の極低出生体重児の施設への入院総数を記した。

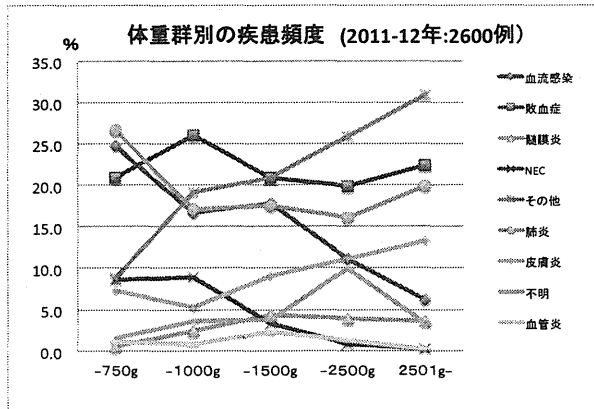
図1. 2000年出生と2010-12年出生におけるVLBWの体重群別感染症発症率



過去3年間の感染症発症率はELBWで上下があり参加施設内容が反映している可能性がある。

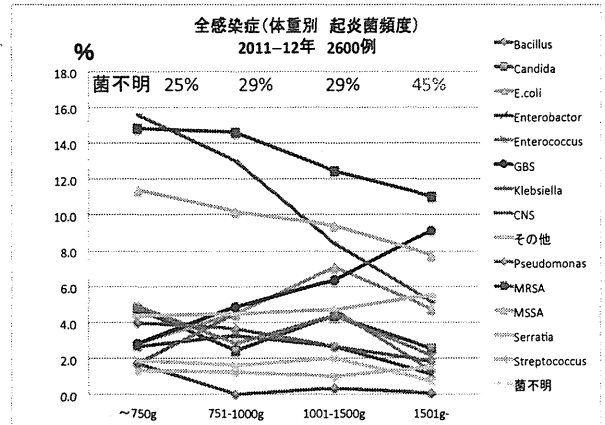
(1) 全感染症について (体重群別) 体重群別に疾患頻度 (各体重群あたり100%として) を図2に示した。

図2. 体重群別の疾患頻度 (2011-12年)



2011年から新感染症診断基準で調査し、さらにバチルス菌も新たに追加したため、体重群別に検討をした。敗血症は体重により差がないが、血流感染は体重が大きくなるほど減少している。肺炎は750g以下に頻度が高く、壊死性腸炎 (NEC) は1000g以下に頻度が高い。

図3. 全感染症における体重群別起炎菌頻度



1000g以下では、MRSA・CNS・MSSAと頻度が高い。3種共に体重群が大きくなるに連れて、減少傾向にある。頻度は少ないがBacillusは750g以下の群に特異的に高い。GBSは体重群が大きくなるにつれて頻度が高くなる。E.coliは1001-1500gの群でピークとなっている。GBSは体重が大きいかほど頻度が高い。

(2) 敗血症・血流感染について (体重群別)

新診断基準で敗血症・血流感染の起炎菌を体重群別で見ると1000g以下の群にはCNSが著明に高く、1000gを超えると急激に低下する。MRSA・MSSAは10%程度で、全体重群に見られる。GBSは750g以上で体重が増加する毎に頻度が上昇している。E.coliは1001-1500gの群が特に高い。Bacillusは750g以下の群にしかない。

図4. 敗血症・血流感染 (体重群別起炎菌頻度)

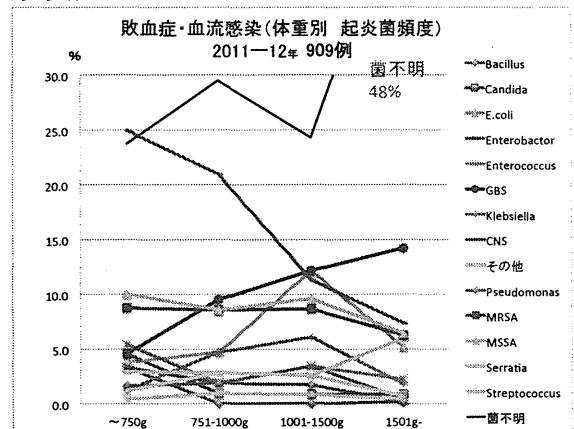
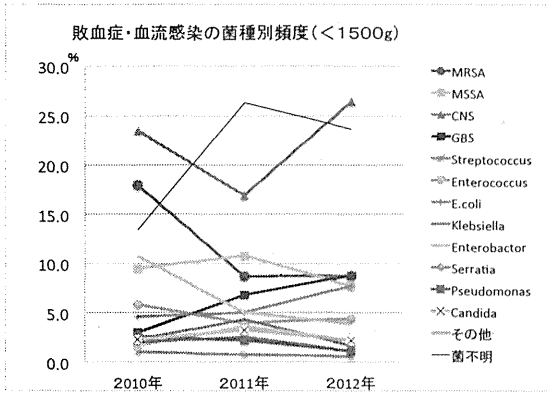


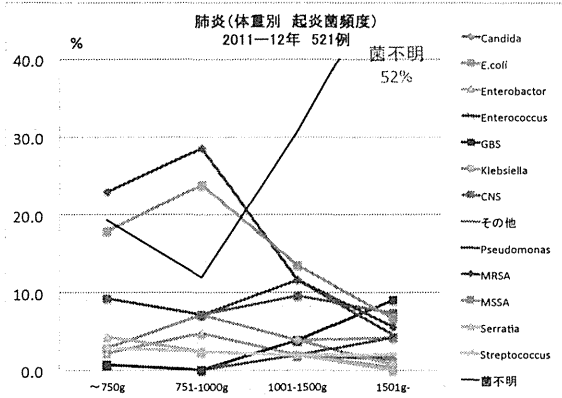
図5. VLBWにおける3年間の敗血症・血流感染の菌種トレンド



CNS が全期間最も頻度が高く、MRSA は2011 以降は低下している。Enterobacter は減少傾向に、GBS は上昇傾向にある。

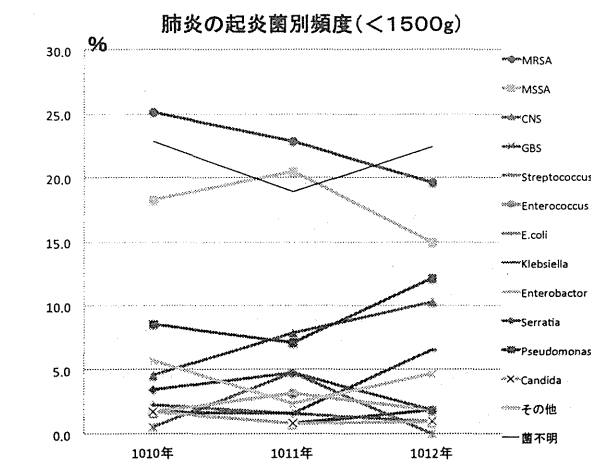
(3) 肺炎について (体重群別)

図6. 肺炎 (体重群別起炎菌頻度)



1000g 以下の群での MRSA・MSSA の頻度が高い。1501g 以上での菌不明の率が 52% と以上に高い。GBS は唯一 1001g 以上で頻度が上昇している。

図7. VLBW における 3 年間の肺炎の菌種トレンド



MRSA は頻度が高いが、この 3 年で徐々に低下している。MSSA も高いが、横ばい。

緑膿菌がそれに次いで高い。CNS は上昇傾向にある。Klebsiella も元来低かったが、上昇してきている。

結果のまとめ

(1) 過去 3 年間の全国 NICU における感染症発症率は ELBW で上下があり参加施設内容が反映している可能性がある。

(2) 全感染症について敗血症は体重により差がないが、血流感染は体重が大きくなるほど減少している。肺炎は 750g 以下に頻度が高く、壊死性腸炎 (NEC) は 1000g 以下に頻度が高い。

(3) 原因菌について、1000g 以下では、MRSA・CNS・MSSA と頻度が高い。3 種共に体重群が大きくなるに連れて、減少傾向にある。頻度は少ないが Bacillus は 750g 以下の群に特異的に高い。GBS は体重群が大きくなるにつれて頻度が高くなる。E.coli は 1001-1500g の群でピークとなっている。GBS は体重が大きいかほど頻度が高い。特に敗血症/血流感染では、原因菌不明が 1500g 以下で 25-30%、1500g 以上では 48% に上昇する。肺炎も同様である。

(4) 結果の項目に続き、資料として以下の小児科学会への提言と三つの論文 (PDF) を添付し紹介する。

- ①小児科学会誌に掲載した「NICU における MRSA の保菌と感染症についての見解と提言」
- ②日本周産期・新生児医学会雑誌に掲載された「末梢穿刺中心静脈カテーテルの管理に関する全国 NICU アンケート調査」
- ③日本未熟児新生児学会雑誌へ掲載された「極低出生体重児における感染症に関する全国調査:2000 年と 2010 年出生児の比較」
- ④ Pediatrics International に掲載された「Prevalence of MRSA colonization in Japanese neonatal care unit patients in 2011」

3) 劇症型壊死性腸炎 (fulminant necrotizing enterocolitis :fNEC) の発症状況とその背景

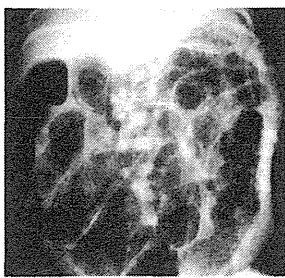
(1) 概要: 過去 10 年間に 42 例の症例 (33 人/基幹 16、9 人/指定 7、1 人/補完 1) が

あり、VLBW 総入院数は推定約 3 万人で発症率 0.14%と考えられ、2008 年から 5 年間で 33/42 (78%) と増加傾向にある。平均在胎期間は 25.9 ± 2.6 w (22.2-34.4)、平均出生体重は 758 ± 314 g (406-2076)、平均発症期間は 24.5 ± 17.6 日 (7-76)、平均発症時哺乳量は 114 ± 44 ml (6-187)、哺乳開始日から平均 4.5 ± 8.4 日 (0-52) で発症、哺乳内容は母乳 36 例 (80%)、混合 3 例 (6.7%)、人工乳 5 例 (11.1%) で、死亡率は 36/45 (84.4%) であった。症状は急激な腸管拡張 (91%)、腸管壁内ガス (49%)、門脈内ガス (40%)、嘔吐 (27%)、血便 (16%) を認めた。便培養では腸球菌 15 例、クレブシエラ 12 例、エンテロバクター 5 例、大腸菌 4 例、クロストリジウム 3 例を各々検出した。一方、血液培養 40 例中 25 例は陰性であった。

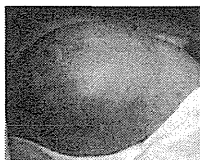
(2) fNEC の定義について

呼吸循環状態が安定している超低出生体重児 (ELBW) が、前兆としての消化器症状がほとんどなく、腹部膨満が急激に起こって発症し、小腸や大腸に腸管壁内ガス像がみられたり、全腸性壊死に近い状態をおこす。

fNEC 症例: 26w4d 968g 男, 双胎大児, 双胎間輸血症候群, RDS。母乳栄養で 12 日までに全量摂取可能となり、3 週間は安定していた。十二指腸チューブの位置を少しだけ短くして 10 時間後に、急激に NEC を発症し、全腸性壊死をおこして死亡した。



発症 30 時間後には腸管壁内ガスが著明に



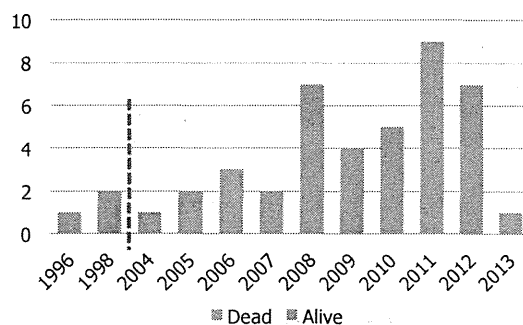
腸球菌と Klebsiella が便と腹水から培養された

(3) fNEC の発症背景について

NICU の回答率	131/431	(30.4%)
VLBW 全入院数	3085/8000	(38.5%)
Probiotics 使用率	74/131	(56.4%)
12 指腸チューブ使用	35/131	(26.7%)

(4) fNEC の年次推移について

劇症型 NEC の年次推移



劇症型 NEC は 2008 年頃から増加傾向に

少ない症例で 2008 年頃から増加傾向にある。

(4) fNEC 症例の背景について

劇症型 NEC : 45 症例	平均	SD	範囲
在胎期間 (週)	25.9	2.6	(22.2-34.4)
出生体重 (g)	758	314	(406-2076)
発症日	24.5	17.6	(7-76)
発症時哺乳量 ml/kg/日	114	44	(6-187)
哺乳開始日	4.5	8.4	(0-52)
哺乳内容	N/45	(%)	
母乳	36	80%	
混合	3	6.7%	
ミルク	6	13.3%	
プロバイオティクス使用	25	55.6%	
12 指腸チューブ使用	14	31.1%	

NEC の少ないはずの母乳栄養が 80.0%

発症時期は、哺乳量が増量されて全量接種に近くなる頃であり、母乳が 80% と高く、しかもプロバイオティクスと 12 指腸チューブの使用率が高い。

(5) fNEC の臨床所見について

劇症型 NEC の臨床所見

臨床症状	N/45	(%)
嘔吐	12	26.7
血便	7	15.6
腸管拡張	41	91.1
腸管壁内ガス	22	48.9
門脈内ガス	18	40
腸管切除術施行	28	62.2
ドレナージのみ	3	6.7
死亡	38	84.4

通常の NEC と異なり、嘔吐や血便が少なく、腸管拡張がその主要所見であり、同時に腸管壁内ガスの検出率が 5 割と高い。腸管切除をおこなっても、死亡率が 85% と非常に高い。

(6) 細菌培養結果について

細菌培養では、便培養で腸球菌が15例で最も多く次いで Klebsiella 12例、Enterobactor 5例、E. coli 4例、Clostridium 3例と続く。敗血症は Klebsiella pneumoniae 3例(血液/便比=3/7:42%)と大腸菌 2例(血液/便比=2/4:50%)にみられ、頻度としては少ない。

細菌培養検査結果

便培養	血液培養
腸球菌: 15	陰性: 26 実施なし: 9
Klebsiella: 12 (K.pneumoniae: 7, K.oxytoca: 5)	K.pneumoniae : 3
Enterobactor: 5	E.coli: 2
CNS: 5	CNS: 2
E.coli: 4	腸球菌: 1
Clostridium: 3	MRSA: 1
Citrobactor: 1	GBS: 1
	Candida: 1

(7) 発症原因の検討

①ミルク内容変更による6症例

1. 発症時期は生後3週以内で、ミルクを増量中が主。平均発症日は16±5日、母乳からミルク内容を変えてから約2日後(2.0±0.9日)に起こっている。

(3週以内発症例は12指腸チューブの使用率(4/27:14.8%)と低い)

2. 起炎菌は腸球菌3例、Klebsiella oxytoca 2例、Clostridium 1例、E. coli 1例、CNS 1例で、血培陽性例は、K. oxytoca と CNS 各1例のみで、1例を除いて全て腸管壁内ガスか門脈ガス陽性で、E. coli と E. faecalis が原因の1例以外は死亡。

3. プロバイオティクスは6例全例と高率(ヤクルトBBG 3例、森永M16-V1例、いずれもB. breve)に使用されていた

②12指腸チューブ使用の5症例

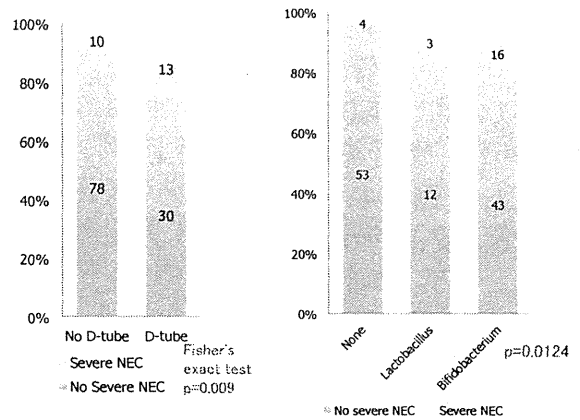
1. 発症は生後3週以後が多く、チューブからの吸引やチューブの位置調整後に短期間で発症。5症例のNEC平均発症日は、32±12日で、チューブから吸引している施設で3例、位置調整後が2例。(3週以後発症12指腸チューブの使用率(10/18:55.6%)と高い)

2. 起炎菌は腸球菌5例共に、Klebsiella 4例、Enterobactor 1例と共同で検出されたが血培は陰性。全て腸管壁内ガスと門脈ガス両者が陽性である。

3. 5例全例にヤクルトBBGが使用されていた。

(8) プロバイオティクスと12指腸チューブの使用について

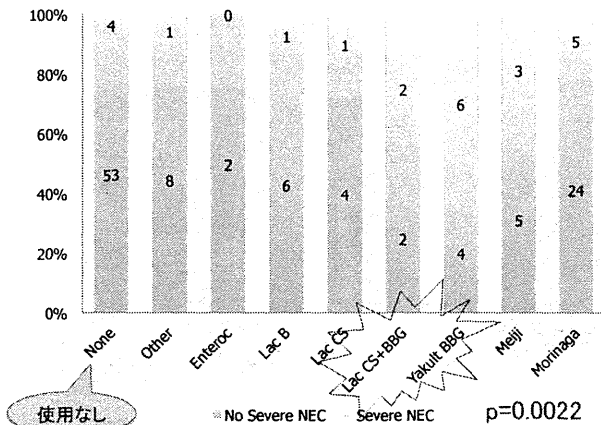
十二指腸チューブの使用(施設別) Probioticsの使用(施設別)



施設別の12指腸チューブ使用頻度は、発症施設の方が高い。同じくプロバイオティクスの使用頻度も発症施設の方が高く、ビフィズス菌が最も高く、乳酸菌がそれに次ぐ。

(9) プロバイオティクスの菌種について

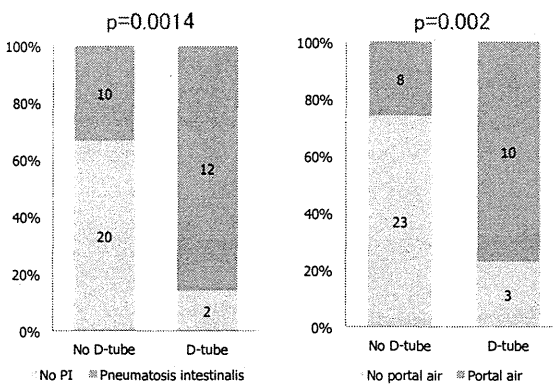
Probioticsの使用と劇症型NECの発生頻度(施設別)
ラクトバチルス/その他 ビフィドバクテリウム



最も発症頻度が高いのは、ヤクルトのBBG(Bifidobacterium)使用施設で約50%に上る。次いで明治、森永と続く。それ以外は少ない。

(10) 12指腸チューブと腸管壁内ガス/門脈内ガスとの関係について

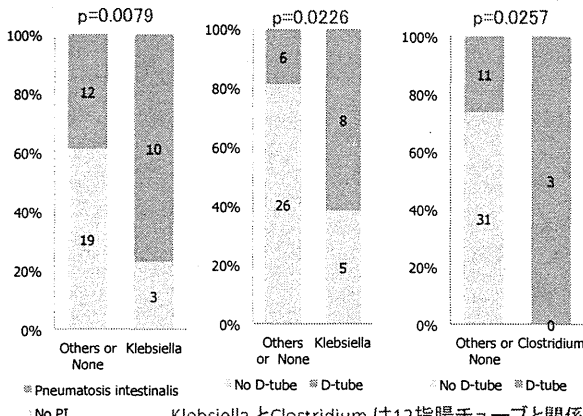
十二指腸チューブ使用と腸管壁内ガス/門脈内ガス(患者別)



12 指腸チューブを使用しているほど両者のガスを呈することが 2-3 倍多い。

(11) 便培養による菌種と腸管壁ガスそして 12 指腸チューブとの関係

便培養検出菌と腸管壁ガス/十二指腸チューブ使用との関係(患者別)



Klebsiella と Clostridium は 12 指腸チューブと関係

腸管壁ガスと最も関係するのが、Klebsiella 属菌であり、それは 12 指腸チューブ使用時にも発症しやすい。またチューブと関係している菌種として Clostridium 属菌 (100%) がある。

結論

1. 劇症型 NEC の発症率は 0.15% と低い、死亡率は 84% と高い。
2. 栄養は母乳のみが 80% と多く、プロバイオティクスが 56% に使用されていた。
3. 発症児の平均週数は 25.9 週、平均発症日は 24.5 日。
4. プロバイオティクスの使用 (ビフィズス菌 16/43 vs 乳酸菌 3/12 vs 使用なし 4/53 : p=0.0124) や 12 指腸チューブ (使用 13/30 vs 非使用 10/78 : p=0.009) の使用施設での発症率が高かった。
5. 乳酸菌よりもビフィズス菌の使用施設の方の発症率が高かった。
6. 起炎菌は腸球菌 15, Klebsiella 12,

Enterobacter 5, E. coli 4, Clostridium 3, 7. 血液培養で陽性であったのは、Klebsiella 3, E. coli 2, 腸球菌 1. と少ない。

8. 腸管壁内ガスを 49%、門脈内ガスを 40% に認め、ガスを認める症例の 80% 以上で 12 指腸チューブ使用。

9. 腸管壁内ガスには Klebsiella が関与。この菌と Clostridium は 12 指腸チューブ使用例に多い。

10. 3 週以内の発症は「母乳からミルク内容の変更」時で哺乳量増量中に多く、3 週以降の発症は「12 指腸チューブ使用中」で管からの吸引と位置直しが関係している。

11. ミルク内容変更の場合、1 種類の菌が多く、12 指腸チューブの場合には、腸球菌と Klebsiella や Enterobacter との合併例が多い。両者ともにプロバイオティクスを使用している事が多く、腸管壁内と門脈内ガスの発生が両者共に多い。

考察

発症/非発症の背景因子には、12 指腸チューブ使用施設に多く、プロバイオティクス使用施設に多かったが、これが fNEC の発症と一部関係している可能性がある。fNEC の具体的な原因は現在の所は不明だが、従来と同じく、ミルク内容の変更も関係していると思われる、急な腸管内ガスの発生貯留に続くショックで腸内細菌叢の急激な交代が起こった結果と考えられた。ただ、このような状況がほとんど母乳哺育中に起こっており、宿主自身の免疫系も含めて、特殊な病態がある可能性も残っている。

E. まとめ

1) NICU における感染症の新診断基準改訂
2015 年に改訂した内容は、基本的に米国の NHSN に準拠した形に血流感染・臨床的敗血症と肺炎を整えたこと、その他の項目に関しては、NHSN の前身である CDC の 1 歳未満の乳幼児の感染症の診断基準にできるだけ合致させて、2012 年までの日本における NICU での感染症のまとめ方を主な基準にした。ただし壊死性腸炎において特発性腸穿孔ではないとか、皮膚炎におい

て TTTS 様発疹症などは日本における特殊な形と考えている。

2) 全国 NICU 感染症データ集計報告 (2010-12 年)

(1) 過去 3 年間の全国 NICU における感染症発症率は ELBW で上下があり参加施設内容が反映している可能性がある。

(2) 全感染症について敗血症は体重により差がないが、血流感染は体重が大きくなるほど減少している。肺炎は 750g 以下に頻度が高く、壊死性腸炎 (NEC) は 1000g 以下に頻度が高い。

(3) 原因菌について、1000g 以下では、MRSA・CNS・MSSA と頻度が高い。3 種共に体重群が大きくなるに連れて、減少傾向にある。頻度は少ないが Bacillus は 750g 以下の群に特異的に高い。GBS は体重群が大きくなるにつれて頻度が高くなる。E. coli は 1001-1500g の群でピークとなっている。GBS は体重が大きいほど頻度が高い。特に敗血症/血流感染では、原因菌不明が 1500g 以下で 25-30%、1500g 以上では 48% に上昇する。肺炎も同様である。

3) 劇症型壊死性腸炎の発症形態とその背景因子を調べる。

(1) 劇症型 NEC の発症率は 0.15% と低いが、死亡率は 84% と高い。

(2) 栄養は母乳のみが 80% と多く、プロバイオティックスが 56% に使用されていた。

(3) 発症児の平均週数は 25.9 週、平均発症日は 24.5 日。

(4) プロバイオティックスの使用 (ビフィズス菌 16/43 vs 乳酸菌 3/12 vs 使用なし 4/53 : p=0.0124) や 12 指腸チューブ (使用 13/30 vs 非使用 10/78 : p=0.009) の使用施設での発症率が高かった。

(5) 乳酸菌よりもビフィズス菌の使用施設の方の発症率が高かった。

(6) 起炎菌は腸球菌 15, Klebsiella 12, Enterobacter 5, E. coli 4, Clostridium 3。

(7) 血液培養で陽性であったのは、Klebsiella 3, E. coli 2, 腸球菌 1. と少ない。

(8) 腸管壁内ガスを 49%、門脈内ガスを 40% に認め、ガスを認める症例の 80% 以上で 12 指腸チューブ使用。

(9) 腸管壁内ガスには Klebsiella が関与。この菌と Clostridium は 12 指腸チューブ使用例に多い。

(10) 3 週以内の発症は「母乳からミルク内容の変更」時で哺乳量増量中に多く、3 週以降の発症は「12 指腸チューブ使用中」で管からの吸引と位置直しが関係している。

(11) ミルク内容変更の場合、1 種類の菌が多く、12 指腸チューブの場合には、腸球菌と Klebsiella や Enterobacter との合併例が多い。両者ともにプロバイオティックスを使用している事が多く、腸管壁内と門脈内ガスの発生が両者共に多い。

F. 文献

特になし

会. 2014. 11. 11

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 大木康史、北島博之、河野美幸、荒川浩一. 末梢穿刺中心静脈カテーテルの管理に関する全国NICUアンケート調査. 周産期・新生児医学会雑誌 第48巻第4号 868-73、2013

2) 大城誠、北島博之. 極低出生体重児における感染症に関する全国調査: 2000年と2010年出生児の比較. 日本未熟児新生児学会雑誌 2014; 26(1):99-104.

3) Morioka I, Takahashi N, Kitajima H. Prevalence of MRSA colonization in Japanese neonatal care unit patients in 2011. *Pediatr Int.* 2014; 56: 211-214

2. 学会発表

1) Hiroyuki Kitajima. Probiotics and Necrotizing Enterocolitis Twenty three-Year's Experiences of Early Administration of Bifidobacterium Breve To Preterm Infants. 4th Shanghai Neonatal Forum, Shanghai, 2013. 4.

2) Hiroyuki Kitajima. Care of very preterm infants in Japan VIII Convegno Internazionale Di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale, Rome, 2013. 11.

3) 北島博之. NICUにおける新生児感染症の推移. シンポジウム 11. NICU 感染対策. 第29回環境感染学会 品川. 2014. 2. 14

4) 北島博之、望月成隆、野崎昌俊、白石淳、平野慎也. NICUにおける劇症壊死性腸炎に関する全国アンケート調査報告 第50回周産期・新生児医学会 横浜. 2014. 7. 14

5) 大木康史、北島博之、大城誠、荒川浩一. NICUにおける末梢穿刺中心静脈カテーテルの管理方法と血流感染率の関連 第59回未熟児新生児学

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

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。2011 年～2014 年にかけて分離された多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析、2012 年度に得られた多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株の分子疫学解析を行った。多剤耐性緑膿菌からは新規のメタロ-β-ラクタマーゼ IMP-type メタロ-β-ラクタマーゼ変異体 IMP-34、IMP-41、IMP-43 および IMP-44 の生物学的・酵素学的性状を明らかにし、メロペネムにより耐性を示す IMP-type が全国に広がりつつあることを明らかにした。さらに、AAC(6′)-Ib、AAC(6′)-Iae および IMP-type メタロ-β-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の開発により、日本で分離される産生多剤耐性緑膿菌の約 8 割を迅速診断可能となった。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。また、2012 年に分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニーにおいてはアミノグリコシド高度耐性を付与する 16S rRNA メチラーゼ ArmA 産生菌が 7 都道府県から分離されたことを明らかにした。

A. 研究目的

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の開発を目指す。

B. 研究方法

1. AAC(6')-Ib産生多剤耐性緑膿菌の迅速診断イムノクロマトキットの開発

Aminoglycoside-acetyltransferase

AAC(6')-IbのHisタグ付き組換え蛋白質をラットに免疫後、ハイブリドーマを作製し、その培養上清より精製した。第一次スクリーニングは、Hisタグ付きAAC(6')-Ibを用いてELISAにより実施した。

株式会社BML総合研究所より分与いただいた217株の多剤耐性緑膿菌臨床分離株を対象に、抗AAC(6')-Ibイムノクロマト試験を実施した。

さらに用いたモノクローナル抗体におけるエピトープマッピングを行なった。

2. 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析

2011年~2014年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株950株(2011年度:169株、2012年度:186株、2013年度291株、2014年度:304株)において当研究部で開発したIMP-typeメタロ-β-ラクタマーゼ、AAC(6')-IacおよびAAC(6')-Ibイムノクロマトキットを用いて迅速診断すると共に、IMPの亜型をPCRおよびシーケンスを用いて決定した。

3. 新規アミノグリコシド耐性因子AAC(6')-Iajの同定

2011年に分離多剤耐性緑膿菌臨床分離株に対し、amikacinに高度耐性(MIC >64 ug/ml)を示す株を対象に、既知のアミノグリコシド耐性因子をコードする遺伝子をPCRによりスクリーニングした。

その中で、未知のアミノグリコシド耐性因子を保有していると思われる株のインテグロンをシーケンスし、耐性因子を同定した。

同定された耐性因子を大腸菌にクローニングし、薬剤耐性を解析するとともに、タンパク質精製し、活性を薄層クロマトグラフィーで確認した。

また、この因子がクロモゾーム上にあるかどうかをサザンブロットにより確認した。

4. IMP-type MBL 変異体 IMP-43 および

IMP-44 の同定

2011年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株に対し、我々の開発したIMP産生緑膿菌迅速診断キットを用いてIMP産生菌をスクリーニングした。イムノクロマト陽性菌からゲノムを抽出し、IMPの亜型をPCRおよびシーケンスで確認した結果、新規IMP variant IMP-43 および IMP-44 を同定した。blaIMP-43 および IMP-44 大腸菌にクローニングし、薬剤耐性を解析するとともに、タンパク質精製し、酵素活性を測定した。

5. 日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析

2012年に分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株からゲノムを抽出し、次世代シーケンサを用いて全ゲノム配列を決定した。全ゲノム配列から薬剤耐性因子を同定すると共に、SNPを抽出し系統解析を実施した。

6. 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 DH5α 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-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. AAC(6')-Ib産生多剤耐性緑膿菌の迅速診

断イムノクロマトキットの開発

モノクローナル抗体のスクリーニングの結果、AAC(6')-Ib に高い反応性を示す8抗体を得た。これら 8 抗体の組み合わせの中で、最も濃いテストラインを生む2抗体 3A9/F1 および 3F9/F1 を用いてイムノクロマトキットを作成した(図 1)。作成したイムノクロマトキットの感度は 7.6×10^6 cfu per test であった。AAC(6')-Ib の全長をカバーする、15 残基のペプチドを設計し ELISA による解析を行った。その結果、得られた抗体のエピトープは、3A9/F1 は AAC(6')-Ib の 171-184aa 領域、3F9/F1 は 61-75aa 領域であった。

217 株の多剤耐性緑膿菌を対象に AAC(6')-Ib イムノクロマト試験を実施した結果、キット陽性 98 株、陰性 119 株であり *aac(6')-Ib* の PCR の結果と完全に一致した。

2. 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析

2011 から 2014 年に分離された 950 株を解析した結果、2011 年に分離された 169 株では、IMP 陽性 107 株 (63.3%)、AAC(6')-Iae 陽性 84 株(49.7%)、AAC(6')-Ib 陽性 34 株(20.1%)、2012 年に分離された 186 株では、IMP 陽性 128 株 (68.8%)、AAC(6')-Iae 陽性 100 株 (53.8%)、AAC(6')-Ib 陽性 42 株(22.6%)、2013 年に分離された 291 株では、IMP 陽性 170 株 (58.4%)、AAC(6')-Iae 陽性 129 株(44.3%)、AAC(6')-Ib 陽性 90 株(30.9%)、2014 年に分離された 304 株では、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。シーケンスにより各年で分離された IMP 陽性株の IMP 亜型を決定した結果、2011 年の IMP 陽性株 107 株の内、IMP-1: 66 株、IMP-6: 2 株、IMP-7: 12 株、IMP-10: 21 株、IMP-43: 5 株、IMP-44: 1 株であった。2012 年の IMP 陽性株 128 の内、IMP-1: 70 株、IMP-6: 13 株、IMP-7: 17 株、IMP-10: 20 株、IMP-34: 3 株、IMP-41: 1 株、IMP-43: 4 株であった。2013 年の IMP 陽性株 170 の内、IMP-1: 82 株、IMP-6: 14 株、IMP-7: 38 株、IMP-10: 26 株、IMP-34: 2 株、IMP-41: 2 株、

IMP-43: 5 株であった。2014 年の IMP 陽性株 176 の内、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。

3. 新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaj の同定

2011 年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株から新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaj が同定された(図 2)。

AAC(6')-Iaj は AAC(6')-Ia と 70% の相同性を持ち、AAC(6')-Iae、AAC(6')-Iaf に比べ、*arbakacin* 耐性が高かった(Table 1)。

同定された *aac(6')-Iaj* 遺伝子はクロモソーム上に存在していた。

4. IMP-type MBL 変異体 IMP-43 および IMP-44 の同定

2011 年に分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株から新規 IMP variant、IMP-43 および IMP-44 を同定した(図 3)。IMP-43 および IMP-44 産生多剤耐性緑膿菌は共にインテグロン内に *aac(6')-Ib* を保有し、ST357 であった。

IMP-43 は全国 5 県に広がっており、IMP-7 とのアミノ酸比較で 1 アミノ酸置換 (Val67Phe) が見られた。IMP-44 は 1 株のみで IMP-11 と比較すると、2 アミノ酸置換 (Val67Phe および Phe87Ser) が見られた。

酵素活性を測定すると、IMP-43 は IMP-7 に比べ、*cefotaxime*、*ceftazidime*、*cefepime*、*dripenem*、*imipenem* および *meropenem* に対して *kcat/Km* 値が高く、*penicillin G*、*ampicillin*、*cephradine* および *cefoxitin* に対し、*kcat/Km* 値が低かった。IMP-44 と IMP-11 においても同様の結果であった。特に IMP-44 は *carbapenem* に対する *kcat/Km* 値が顕著に高かった (Table 2)。

5. 日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析

日本の医療施設 (7 県、12 医療施設) (図 4) から分離された多剤耐性アシネトバクター 49 株において種々の薬剤に対する MIC を調べたところ、アミノグリコシド系薬に対する MIC が全ての株で高度耐性を示した

(Table 3)。全ゲノム解析を行った結果、全ての株から 16S rRNA methylase *ArmA* をコードする遺伝子 *armA*、アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 *aac(6')-Ib* が検出された。さらに、山口県の 2 医療施設から分離された 4 株においてはカルバペネム系薬に対し MIC >64µg/ml 以上の高度耐性を示し、*blaOXA-72* を保有していた。

分子系統解析の結果、大きく 3 つの clade に分かれ、シークエンスタイピング (ST) 208 を示す clade、ST455 を示す clade および ST512 を示す clade に分かれた (図 5)。*blaOXA-72* 保有株 4 株は ST512 clade に分類された。

また、ゲノム解析から *armA* 遺伝子はクロモソームに存在していることが明らかとなった。

6. 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_{IMP-34}-aac(6')-Ib-qacEdeltaI-sulI-orfX-tniBdelta-tniA* が同一ゲノム上に 2 か所確認された(図 6)。

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 1)。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. AAC(6')-Ib 産生多剤耐性緑膿菌の迅速診断イムノクロマトキットの開発

過去、我々の開発した AAC(6')-Iae および IMP-type MBL 産生多剤耐性緑膿菌臨床分離

株迅速診断キットと本年開発した 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。

2. 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析

2011 年から 2014 年にかけて日本の医療施設から分離された多剤耐性緑膿菌臨床分離株の薬剤耐性因子を比較した結果、IMP 産生株及び AAC(6')-Iae 産生株は減少傾向にあり、AAC(6')-Ib 産生株は増加傾向にあることが明らかとなった。さらに、IMP タイプの亜型においては 2010 年までには見られなかった新たな IMP タイプである IMP-34, -43, -44 が出現し、関東地方を中心に広がりつつあることが明らかとなった。これらの亜型はメロペネムにより強い活性を示すことが分かっており、今後、モニタリングを続けていくことが重要であることが示唆された。

3. 新規アミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iaj の同定

AAC(6')-Iaj 産生多剤耐性緑膿菌は大阪で分離された。現在、日本の医療施設に広まっている AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌に比べ、*arbakacin* 耐性が高く、今後、注意深くモニタリングしていく必要がある。

また、*aac(6')-Iaj* 遺伝子を含む integron は 1975 年にイギリスで分離された緑膿菌由来 plasmid R1033(accession no. U12338)に存在する In4 integron にゲノム環境が類似していることが分かった。

4. IMP-type MBL 変異体 IMP-43 および IMP-44 の同定

IMP-7 と IMP-43 および IMP-11 と IMP-44 のアミノ酸配列をそれぞれ比較した結果、67 番目のアミノ酸が Val から Phe に変異していた。Subclass B1 に属する MBL の 60 から 66 番アミノ酸残基は基質との相互作用に重要な active loop を形成することが分か

っている。この変異が酵素活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、IMP-11 と IMP-44 のアミノ酸比較では 67 番目に加え、87 番目アミノ酸残基も Phe から Ser へ変異していた。87 番目アミノ酸残基は IMP と同じ subclass B1 に分類される VIM-2 において酵素の stability と folding に関係していると報告されている。この 87 番目の変異によるベンゼン環の欠損は IMP-44 におけるより効率的な carbapenem の分解に寄与している可能性が考えられた。

5. 日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析

2012 年に分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株 49 株は全て高度アミノグリコシド耐性を示し、16S rRNA methylase ArmA をコードする遺伝子 *armA* が検出された。過去、日本で *armA* 遺伝子を保有するアシネトバクターバウマニーの報告は少なく、高頻度での分離報告はない。

高度アミノグリコシド耐性に寄与する 16S rRNA methylase 産生菌の報告は、中国、韓国、東南アジア諸国で多く報告されている。よって、これらの国々から日本に持ち込まれた可能性が高いと考えられる。

今後も持続的なモニタリングを続けると共に、16S rRNA methylase 産生高度アミノグリコシド耐性菌を迅速に検出できるシステムを開発する必要があると思われる。

6. 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、我々の開発した迅速診断キットを用いることで日本で分離される多剤耐性緑膿菌の約 8 割が迅速に検出可能であることが分かった。また、カルバペネム系薬に対してより高い耐性を示す IMP-type MBL の新興も明らかとなった。さらに、我々の行った日本の医療施設で分離された多剤耐性アシネトバクターバウマニー臨床分離株の分子疫学解析から、高度アミノグリコシド耐性を付与する 16S rRNA メチラーゼ産生株の出現が明らかとなった。以上のことから、今後、より詳細なモニタリングが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

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- β -lactamase and ArmA 16S rRNA methylase producing *Providencia rettgeri* clinical isolates in Nepal. *BMC Infect Dis.* 2014; 14(1): 56.
 - 12) Hamada Y, Watanabe K, Tada T, Mezaki K, Takeuchi S, Shimizu T, Kirikae T, Ohmagari N. Three cases of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* blood stream infection in Japan. *J Infect Chemother.* 2013; 19(5): 956-958.
 - 13) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Mishra SK, Ohara H, Shimada K, Kirikae T, Pokhrel BM. Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 42(4): 372-374.
 - 14) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. IMP-43 and IMP-44 metallo- β -lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(9): 4427-4432.
 - 15) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, Phuong DM, Thu TA, Binh NG, Anh NQ,

- Nga TT, Truong PH, Xuan PT, Thu LT, Son NT, Kirikae T. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infect Dis*. 2013; 13(1): 251.
- 16) Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T: Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* 8(6): e66358.
- 17) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Sah MK, Ohara H, Kirikae T, Pokhrel BM. NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(5): 2394-2396.
- 18) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. Novel 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase AAC(6')-Iaj from a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(1): 96-100.
- 19) Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Kitao T, Shimada K, Kirikae T. Development of an immunochromatographic assay for rapid detection of AAC(6')-Ib-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods*. 2012; 91(1): 114-6
2. 学会発表
- 1) 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) 多田達哉・秋山徹・切替照雄. IMP-43 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
- 3) Teruo Kirikae. Dissemination of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and emergence of OXA-72 carbapenemase-coproducers in Japan. Japan-Korea Symposium, The 25th Annual Meeting of Japanese Society for Clinical Microbiology、平成26年2月、名古屋
- 4) 多田達哉・秋山徹・島田佳世・小原博・Pokhrel M Bharat・切替照雄. ネパールの医療施設で分離された院内感染起因菌としても多剤耐性グラム陰性菌の解析、第42回薬剤耐性菌研究会、平成25年10月、熱海
- 5) 多田達哉・秋山徹・切替照雄. 日本の医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の分子疫学解析、第86回日本細菌学会総会、平成25年3月、幕張
- 6) 多田達哉・秋山徹・島田佳世・切替昭雄. 医療施設で分離される多剤耐性緑膿菌株の解析、第41回薬剤耐性菌研究会、平成24年10月、下呂
- 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 |

Strain ^a	MIC ^b (µg/ml)									
	AMK	ABK	DIB	GEM	ISP	KAN	NEO	NET	SIS	TOB
NCGM1588	128	32	1024	8	512	1024	256	>1024	1024	128
<i>E. coli</i> DH5α/pSTV28	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.25	1	0.25
<i>E. coli</i> DH5α/pSTV28-aac(6)-Iaj	16	4	16	0.5	4	32	8	32	4	16

^a The MICs for *E. coli* strains were determined with Mueller-Hinton broth preparations containing chloramphenicol (30 µg/ml) and individual aminoglycoside.
^b AMK, amikacin; ABK, arbekacin; DIB, dibekacin; GEM, gentamicin; ISP, isopamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycine; NET, netilmicin; SIS, sisomicin; TOB, tobramycin.

Table 1

Substrate	<i>K_m</i> (µM) ^a				<i>k_{cat}</i> (s ⁻¹) ^a				<i>k_{cat}/K_m</i> (µM ⁻¹ ·s ⁻¹) ^a			
	IMP-7	IMP-43	IMP-11	IMP-44	IMP-7	IMP-43	IMP-11	IMP-44	IMP-7	IMP-43	IMP-11	IMP-44
Penicillin G	207±19	3176±236	574±18	482±53	25.3±0.7	64±3	36±2	14±1	0.12	0.02	0.063	0.029
Ampicillin	180±10	494±40	230±21	627±80	9.1±0.6	3.5±0.2	7.4±0.6	11±1	0.051	0.0072	0.032	0.017
Cephadrine	27±2	69±5	39±4	119±8	8.0±0.3	10.3±0.8	14.6±0.7	14.1±0.2	0.29	0.15	0.38	0.12
Cefoxitin	33±1	55±5	4.4±1.2	53±5	4.18±0.05	3.48±0.05	3.2±0.1	12±1	0.13	0.062	0.76	0.22
Cefotaxime	24±2	6.8±0.9	35±4	27±3	1.88±0.07	7.2±0.1	4.3±0.2	44±1	0.08	1.1	0.12	1.6
Ceftazidime	59±4	14±2	29±3	63±4	0.89±0.05	1.9±0.1	1.33±0.09	5.6±0.2	0.015	0.14	0.046	0.089
Cefepime	50±6	30±4	40±5	64±5	1.34±0.04	4.6±0.1	2.00±0.04	19.4±0.7	0.027	0.16	0.05	0.31
Aztreonam	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b	NH ^b
Dripenem	63±5	59±7	101±10	257±27	6.8±0.2	10.0±0.4	11.3±0.6	589±40	0.11	0.17	0.11	2.3
Imipenem	254±20	268±23	142±7	119±11	20±1	49±2	19.2±0.5	165±5	0.078	0.18	0.13	1.4
Meropenem	59±7	24±2	50±5	137±16	2.6±0.2	8.2±0.3	5.9±0.2	335±13	0.044	0.34	0.12	2.5

^a The *K_m* and *k_{cat}* values represent the means of three independent experiments ± standard deviations.
^b NH; no hydrolysis was detected under conditions with a substrate concentration of up to 1mM and an enzyme concentration of up to 700nM.

Table 2

MIC₅₀ and MIC₉₀ values and percent antimicrobial resistance of *A. baumannii* clinical isolates

Antimicrobial agent	<i>A. baumannii</i> (n=49)				
	Breakpoint for resistance ^a (µg/ml)	% Resistance	Range (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)
Amikacin	≥64	100	>1,024	>1,024	>1,024
Arbekacin	-	-	1,024->1,024	>1,024	>1,024
Colistin	≥4	8	≤0.25-4	2	2
Ciprofloxacin	≥4	100	32-1,024	256	512
Gentamicin	≥16	100	512->1,024	>1,024	>1,024
Imipenem	≥16	100	16-64	16	64
Meropenem	≥16	100	16-128	16	128
Tigecycline ^b	-	-	≤0.25-4	1	4

^a Break points for antimicrobial resistance were determined according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (M07-A9).

^b MICs to tigecycline were 4 µg/ml for 6 isolates, 2 µg/ml for 7, 1 µg/ml for 18, 0.5 µg/ml for 12, and ≤0.25 µg/ml for 6.

Table 3

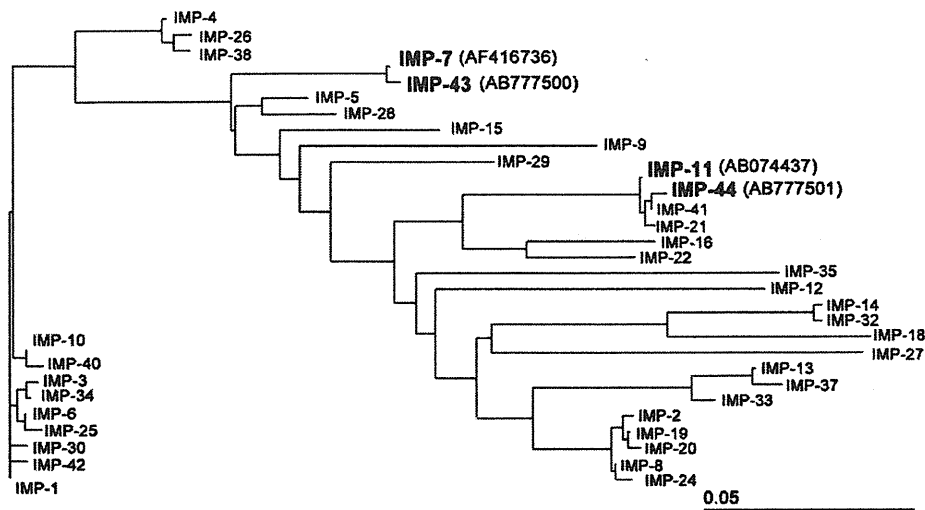


Fig. 3

49 isolates of multidrug-resistant *A. baumannii*
(July 2012 - December 2012)

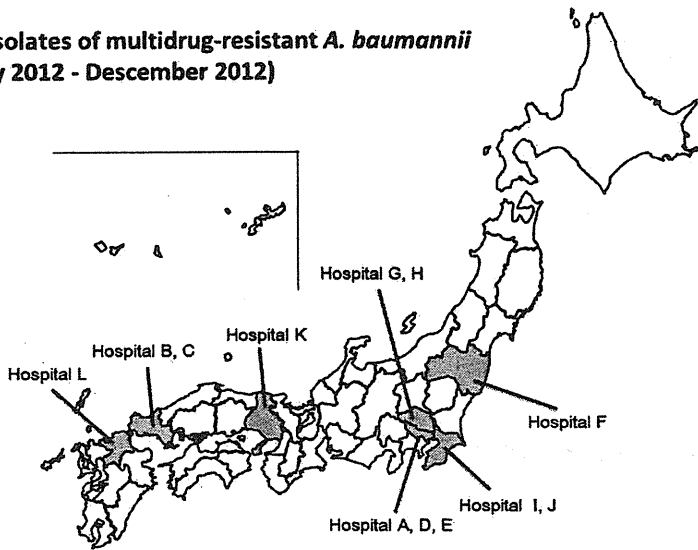


Fig. 4

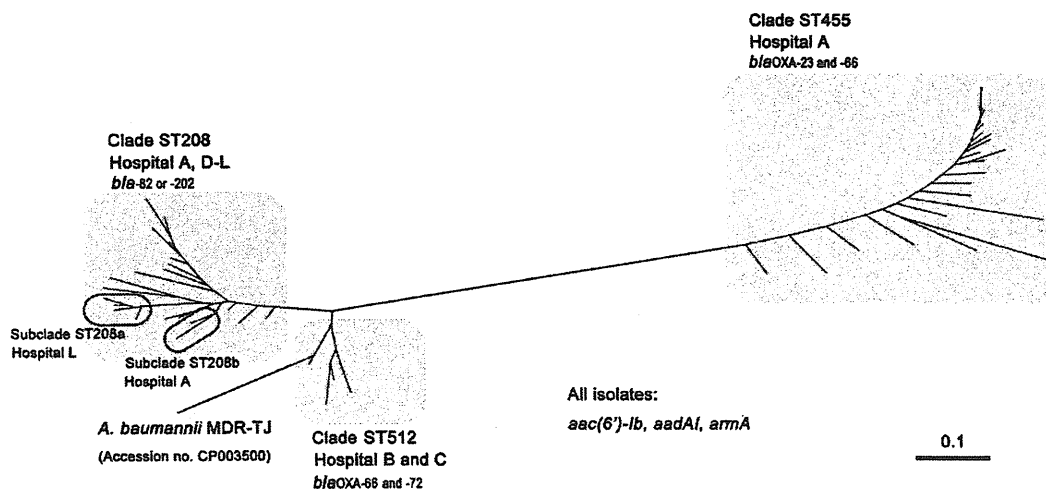


Fig. 5

同構造のインテグロンカセットが染色体上に2か所

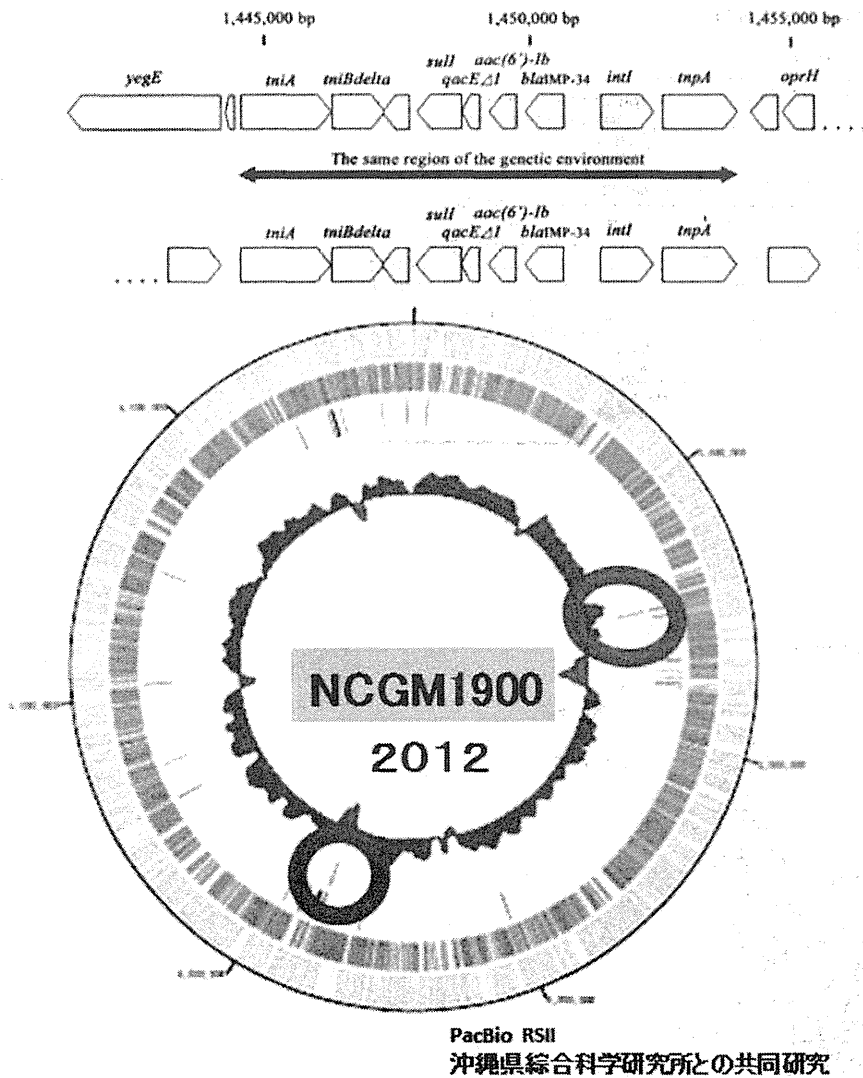


Fig. 6

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 新型の薬剤耐性菌の構造と立体構造に立脚した
検出剤の分子設計並びに迅速・簡便検査法の確立

研究分担者 黒崎 博雅 (熊本大学大学院生命科学研究部・准教授)
研究協力者 山口 佳宏 (熊本大学環境安全センター・准教授)

研究要旨

本研究では、*Citrobacter freundii* 由来の KHM-1、*Acinetobacter* spp. 由来の IMP-2 および *Serratia marcescens* 由来の IMP-1 とその 120 位のアスパラギン酸をグルタミン酸に置き換えた変異体 (D120E) の citrate 複合体、計 4 種類のメトロ-β-ラクタマーゼの結晶構造を決定した。これらの結晶構造の比較から、基質認識と取り込みに重要であると考えられているループ 1 の可動性は、68 位のアミノ酸の変異によって大きく変化することがわかった。KHM-1 と IMP-1 の活性ポケットは KHM-1 の方が IMP-1 よりも広いことがわかった。このため、KHM-1 はセフトジジムのような嵩高い置換基を持った β-ラクタム剤を活性中心ポケットに取り込み易くなり、セフトジジムをより加水分解し易くなっていることがわかった。さらに、本研究では citrate 骨格をもつ化合物 (citrate モノ-ベンジルエステル) が IMP-1 のみならず全てのメトロ-β-ラクタマーゼに対する阻害剤のリード化合物となり得ることを見出した。

A. 研究目的

カルバペネム系 β-ラクタム剤をはじめほとんど全ての β-ラクタム剤に耐性を持ち、さらに既存の β-ラクタマーゼ阻害剤に対し感受性を持たない薬剤耐性菌の単離が相次いでいる。その原因の一つにメトロ-β-ラクタマーゼの産生が挙げられている。

メトロ-β-ラクタマーゼの多くは、それらの遺伝子が伝達性プラスミド上に存在することから、菌種を越えた伝播が可能であり世界的な蔓延が進みつつある。

そこで本研究では、臨床株から単離された種々のメトロ-β-ラクタマーゼの構造機能解析を行い、基質取り込みならびに β-ラクタム加水分解機構を明らかにすることを第一の目標とした。さらに、メトロ-β-ラクタマーゼの立体構造に基づいた臨床で使用できるメトロ-β-ラクタマーゼ阻害剤となりうるリード化合物の探索を第二の目標とし、平成 24 年度から平成 26 年度までの

3 年間研究を行った。

B. 研究方法

(1) KHM-1 遺伝子 (bla_{KHM-1}) のクローニング

KHM-1 遺伝子 (bla_{KHM-1}) は pET28a ベクターにサブクローニング (KHM-1/pET28a) した。

(2) KHM-1, IMP-2 と IMP-1 およびその 120 位変異体 (D120E) の培養と精製

KHM-1, IMP-2, IMP-1 および D120E の培養・精製は、我々が既に報告した方法に従って行った [Biol. Pharm. Bull. 27(6), 851-856 (2004); J. Biol. Chem. 28(21), 20824-20832 (2005)]。

(3) KHM-1 の結晶化

5 mg/mL の KHM-1 酵素溶液 (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)) とリザーバー溶液 (20