

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

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）

研究要旨：2000 年代以降、カルバペネマーゼを産生する肺炎桿菌などのいわゆる CRE（カルバペネム耐性腸内細菌科細菌）や OXA 型カルバペネマーゼなどを産生する *Acinetobacter* 属菌などが欧米諸国のみならずアジアや中東さらにアフリカ地域などの途上国でも広がり大きな問題となっている。そこで、分担研究者である荒川の研究グループは、平成 24-26 年の 3 年間に、国内の臨床分離株から発見された新型のメタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の X 線結晶構造解析に加え、新型アミノグリコシドアセチル化酵素 AAC(6')-Ib-an、さらに新型のホスホマイシン不活化酵素 FosK などを新たに発見しそれらについて解析を行うとともに、新型のメタロ-β-ラクタマーゼ TMB-2 を産生する *Acinetobacter soli*、FosA3 を産生する健康人由来大腸菌、さらに、ペニシリン低感受性を獲得した B 群レンサ球菌(PRGBS)、フルオロキノロン耐性肺炎桿菌、肺炎患者の血液培養で分離された肺炎桿菌などの調査や分子疫学解析を行った。同時に、FosA3 などのホスホマイシン不活化酵素を産生する菌株の簡便検出法や *Acinetobacter* 属菌の簡便な同定法および *A. baumannii* 国際流行クローンの迅速簡便識別法などの新しい解析手法を構築した。以上のように、医療現場における多剤耐性菌の解析や対策に貢献すると期待される様々な成果を上げた。

研究協力者

名古屋大学大学院医学系研究科

川村久美子（准教授） 木村幸司（講師）

山田景子（助教） 和知野純一（助教）

同上 大学院生

永坂由紀子、伊藤亮太、中根邦彦、横山覚、
坂野弘嗣、北仲博光、後藤謙介、服部達也、
村竜輝、佐藤夏巳

同上 医学部学生

中村元気、鈴木健史、山田涼子

愛知県衛生研究所

鈴木匡弘

国立感染症研究所

松井真理、長野由紀子

信州大学大学院

長野則之

熊本大学大学院

黒崎博雅、山口佳宏

A. 研究目的

医療先進地域である欧米のみならず、途上国でもカルバペネムに耐性を獲得した腸内細菌科の細菌やアシネトバクター属菌などの新型多剤耐性菌が増加し深刻な問題となってい

る。それらに加え、様々な新しい薬剤耐性菌も出現しつつあるが、それらの獲得した新しい薬剤耐性機構には未解明な部分が多く残されている。さらに、新規に出現しつつある新型薬剤耐性菌を検出するための検査法や解析法も十分に考案や構築されていない。また、新型多剤耐性菌の実態や動向も十分に把握されているとは言い難い。そこで、荒川の研究グループは、このような事態の克服に貢献すべく新型多剤耐性菌を中心に、基礎的研究から分子疫学解析、新規の検査・解析法の開発等において多面的、総合的な研究を展開した。

B. 研究方法

a. 新規薬剤耐性機構に関する研究

1. 新型メタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 に関する研究

2010 年に厚生労働省が実施したカルバペネム耐性腸内細菌科の菌種に関する全国調査で分離されたカルバペネム耐性セラチア・マルセスセンスについてカルバペネム耐性に関与

する遺伝子をクローニングし、その遺伝子の産物である酵素の精製と結晶化、および X 線結晶構造解析等を行った。

2. アミカシン高度耐性アシネトバクター属菌に関する研究

アミカシンに中等度耐性(MIC, 64-256 μ g/ml)を示す、アシネトバクター属菌から、アミカシン耐性に関与する遺伝子領域をクローニングし、その塩基配列とともにその遺伝子が担う酵素について詳しい解析を行った。

3. カルバペネム耐性アシネトバクター属菌に関する研究

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について、菌種の同定とカルバペネム耐性に関与する遺伝子の解析を行った。

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

前述の外傷患者の血液由来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

海外から帰国あるいは訪日した患者よりカルバペネムを含む多剤に耐性を獲得した腸内細菌科の細菌等が分離されたため、多剤耐性に関与する分子メカニズムを解析した。

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

国内の医療機関で分離されたセフチブテン耐性でペニシリン感性の B 群レンサ球菌について PBP の解析などを実施した。

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

国内の医療機関で分離されたセフチゾキシムの高度耐性(MIC, 256 μ g/ml)を示す B 群レンサ球菌について PBP の解析などを実施した。

8. 非溶血性で小コロニー形態を示す PRGBS の解析

臨床分離される PRGBS の中に、羊血液寒天平板上で小コロニー形態を呈し、しかも非溶血性を示す株があることに気がついたため、それらの解析を行なった。

9. QnrA 保有大腸菌の特性に関する解析

QnrA を保有する大腸菌における FQ 耐性獲得に対する影響について解析を行なった。

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

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。

2. フルオロキノロン耐性肺炎桿菌の分子疫学解析

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。

3. PRGBS の多剤耐性獲得状況に関する研究

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。

4. 市販食肉等由来大腸菌の分子疫学解析

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。

5. 肺炎患者の血液由来肺炎桿菌の分子疫学解析

国内の医療機関で肺炎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。

6. ペニシリン低感受性 GBS の院内感染について報告した

国内の同一医療機関で分離された一連のペニシリン低感受性 GBS について分子疫学的な解析を行ない、それらの遺伝的クローナリティーについて解析した。

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

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、特異度等を比較解析した。

8. 臨床分離株における PRGBS の調査

1977 年より 2005 年にかけて臨床分離された GBS について PRGBS の分離率を調査した。

9. 妊婦から分離された GBS の調査

妊婦より臨床分離された GBS について PRGBS の分離率を調査した。

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

臨床分離された 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。

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

大腸菌に対してホスホマイシンに高度耐性を与える FosA3 などのホスホマイシン-グルタチオン転位酵素を産生する株を簡便に検出可能な検査法を構築した。

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

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。

3. GBSを高感度かつ迅速に検出するLAMP法の開発

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。

4. 自動検査装置によるPRGBSの検出感度の評価

VITEC(R)2システムを用いた場合のPRGBSの検出感度等を検討した。

d. その他

1. PRGBS等の分類に関する提案を行なった

ペニシリンやセファロsporinに低感受性や耐性を獲得した GBS について、それらの分類法を国際的に提案した。

2. 16S rRNAメチレーズとその産生株に関する英文総説の執筆

プラスミド媒介性の 16S rRNAメチル基転移酵素(メチレーズ、メチルトランスフェラーズ)に多くのタイプが出現しつつあることから、それらの研究を促すため、関連する情報を整理し、英文総説を執筆した。

倫理面への配慮

本研究では、原則として患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用した。しかし、患者の診療情報を含めた解析を実施する場合は、名古屋大学大学院医学研究科の医学研究、疫学研究の倫理委員会にあらかじめ研究計画書を提出し、疫学研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省)に基づき審査を受け承認

された後に、研究を実施した。

C. 研究結果

a. 新規薬剤耐性機構に関する研究

1. 新型メタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1に関する研究(和知野、他)

臨床分離カルバペネム耐性 *Serratia marcescens* より発見したメタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の X 線結晶構造解析を行い、その詳細な構造を決定した。SMB-1 の構造は他のサブクラス B3 であるメタロ-β-ラクタマーゼである L1 や BJP-1 と酷似していた。しかし、-ラクタム薬に対する加水分解活性は3者で大きく異なるため、さらに個々のアミノ酸レベルで詳細な比較を行った。その結果、SMB-1 においては 157 番目のグルタミンの存在が基質認識に重要であるものと予測された。本アミノ酸は SMB-1 のみに存在し、L1 や BJP-1 には存在しない。そこで、アラニン変異体を作成し、酵素活性を測定したところ、触媒効率(k_{cat}/K_m)が大きく低下した。したがって、157番目のグルタミンは SMB-1 において、その酵素活性の発揮に重要な部位であることがわかった。さらに、メタロ-β-ラクタマーゼの阻害剤であるメルカプト酢酸との共結晶を作製し、その構造を決定した。メルカプト酢酸のチオール基は2つの亜鉛原子(Zn1 と Zn2)に配位していた。また、1つの酸素原子が Zn2 と結合しており、メルカプト酢酸は Zn2 との間にキレート環を形成していた。

2. アミカシン高度耐性アシネトバクター属菌に関する研究(金、和知野、他)

本邦で分離される腸内細菌科細菌のアミカシン耐性に関する分子機構には不明な点が多く残されている。そこで、本研究では腸内細菌科細菌を対象に、アミカシン耐性機構の解明を試みた。その結果、アミカシンに対する主たる耐性因子として、16S rRNA MTase とともに、AAC(6')に分類されるアミノグリコシドアセチル化酵素が関与していることがわかった。AAC(6')-Ia や AAC(6')-Ib といった既知アミカシン耐性遺伝子の他、これらの新規亜型である AAC(6')-Ian を発見した。本研究により、腸内細菌科細菌におけるアミノグリコシド耐性機構が多様化しつつある状況をあきらかにした。

3. カルバペネム耐性アシネトバクター属菌に

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和判定される 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 の解析やアリル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、ヒトで分離されやすい 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 は検出されないことが確認された。

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ズ)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とめられている。

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考えられる。

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-β-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 β -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.* 2011;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-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 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-lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo-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-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)

“β-ラクタム系抗菌薬低感受性 A 群 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

「骨髄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