

## 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 多剤耐性菌のベータラクタマーゼの解析

研究分担者 舘田 一博 （東邦大学医学部微生物・感染症学講座）  
研究協力者 石井 良和 （東邦大学医学部微生物・感染症学講座）  
青木 弘太郎 （東邦大学医学部微生物・感染症学講座）

#### 研究要旨

2007 年から 2011 年にかけて複数の医療施設から分離されたメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) 産生 *Enterobacter cloacae* 71 株は、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) の結果 7 つの PFGE グループに分けられ、それぞれ特定の施設からの分離株であった。また、ST78 に属する菌株が 3 施設に渡って分離された。全株において IMP-1 グループに属する遺伝子が検出され、本遺伝子は 2 パターン (A および B) のクラス 1 インテグロン内に存在した。パターン A インテグロンは 3 施設で分離された複数の PFGE グループおよび ST に属する菌株から検出され、IncHI2 プラスミドに媒介されていると考えられた。パターン B インテグロンは同一施設の分離株から検出され、主に IncW プラスミドに媒介されていると考えられた。IMP-1 産生 *E. cloacae* のうち院内環境で成功にしているクローンの存在が示唆され、*bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子は複数起源のプラスミドに媒介されていると考えられた。また、こういったカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の多くは IPM を含むカルバペネム系薬に耐性を示さないことから、当薬剤でスクリーニングすることは困難である。したがって、ラタモキセフ (LMOX) に対して非感性を示す菌株に対して、市販キットのカルバペネマーゼ産生確認試験を行うことで、効率良く CPE の検出が可能であると考えられた。

#### A. 研究目的

カルバペネム系薬はグラム陰性菌感染症治療に対する最後の切り札として位置づけられている広域抗菌薬である。しかし、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) はアズトレオナムを除く、カルバペネム系薬を含むすべての $\beta$ -ラクタム系抗菌薬を不活化する活性を有する。MBL をコードする遺伝子は多くの場合、伝達性のプラスミド上に存在し、IMP 型遺伝子は高頻度にクラス 1 インテグロン内に存在することが知られる。

我々は、ある一定期間内に都内 3 医療施設

において MBL 産生 *Enterobacter cloacae* が連続して複数分離された事例を受けて、それらの菌株間の関連性を明らかにするべく、MBL の遺伝子型別および分子疫学的解析を行なった (H24 年度)。さらに、MBL 遺伝子の周辺領域 (インテグロン) およびそれらが宿されるプラスミドの性質を明らかにするべく、次世代シーケンサー (NGS) を用いた解読および解析を行なった (H25 年度)。また、感染症法が改正され、平成 26 年 9 月 19 日よりカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症が 5 類感染症全数把握疾患に

指定されたことを受け、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の効率的な検出方法について検討した (H26 年度)。

## B. 研究方法

2007 年から 2011 年にかけて都内 3 医療施設 (A, B および C 施設) において、分離された MBL 産生 *E. cloacae* 71 株を供試した (A 施設: 20 株, B 施設: 40 株, C 施設: 11 株)。

薬剤感受性検査は、Clinical laboratory standards institute (CLSI) の文章 (M100-22) に準拠した微量液体希釈法にて実施した。対象薬剤はイミペネム (IPM)、セフォタキシム (CTX)、セフェピム (CFPM)、アズトレオナム (AZT)、ピペラシリン/タゾバクタム (PIPC/TAZ)、ラタモキシセフ (LMOX)、アミカシン (AMK) およびシプロフロキサシン (CPFX) とした。

PCR による MBL 遺伝子の型別は既報に則った (J Clin Microbiol. 2003 Dec; 41(12): 5407-13.)。

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) は GenePath 試薬キット (BIO-RAD) の添付文書に則って実施した。バンドパターンのクラスタ解析には Fingerprinting II (BIO-RAD) を用いた。

次世代シーケンス解析には、ベンチトップ型 NGS の MiSeq (イルミナ) にてペアエンドリード (300bp × 2) の解読を行った。アセンブルには CLC genomics workbench (CLC bio) を、Multilocus sequence typing (MLST)、外来性薬剤耐性遺伝子検索およびプラスミドレプリコンタイピングは CGE server (<http://www.genomicepidemiology.org/>) の MLST1.7, ResFinder2.1 および PlasmidFinder1.2 を用いた。

また、CRE の効率的な検出方法に関する検討には、各種カルバペネマーゼ産生株 94 株、Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生株 3 株および AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株 2 株の腸内細菌科細菌、計 99 株を供試した (表)。

薬剤感受性検査は、Clinical laboratory standards institute (CLSI) の文章に準拠

した微量液体希釈法にて実施し、フローズンプレート '栄研' (栄研化学) を用いた。測定薬剤は、IPM, MEPM および LMOX (ラタモキシセフ) とした。

カルバペネマーゼ産生確認試験として市販キットの RAPIDEC CARBA NP (bioMérieux), シカベータテスト (関東化学) およびクイックチェイサー IMP (ミズホメディー) を用いた。

## 倫理面への配慮

本研究課題の一部の供試菌株は、東邦大学医学部倫理委員会において、課題番号: 25068、課題名: 複数の医療施設から分離されたメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Enterobacter cloacae* に関する分子疫学的検討、課題番号: 26037、課題名: 東京都立小児総合医療センターで臨床分離されたメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生グラム陰性菌のプラスミドの遺伝子解析として承認を得た。他の供試菌株は 課題番号: 25032、課題名: 全国医療施設からの臨床分離株の薬剤耐性および遺伝型の依頼解析として倫理委員会の承認について非該当の判定を受けた。

## C. 研究結果

薬剤感受性検査の結果、供試菌株は CTX および LMOX に対しては 100% の耐性率を示し、IPM に対する耐性は 22.5% であった (表 1)。AMK に耐性を示す株はなかった。

全 71 株は IMP-1 グループ属する酵素をコードする遺伝子を有していた。

PFGE の結果、解析パラメータ Dice (Opt: 1.50%) (ToI 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]、相同性カットオフ 85% としたとき、7 つのグループに分けられた (図)。また、各グループには特定の施設から分離された菌株が属していた。例外として、グループ 1 およびグループ 2 に属する菌株は複数施設から分離された菌株が属していた。

MLST の結果、PFGE グループは特定の ST に属する菌株で占められていた (図)。また、ST78 に属する菌株は 3 施設から分離されて

いた。

外来性薬剤耐性遺伝子検索および IMP 型遺伝子が存在するインテグロンの解析の結果、61 株で *bla*<sub>IMP-1</sub> の全長配列が検出された。また、当遺伝子は 2 パターンのクラス 1 インテグロンに存在することが明らかとなった。パターン A インテグロンは *bla*<sub>IMP-1</sub>, *aac*(6')-*IIc* の遺伝子カセットを有しており、パターン B インテグロンは *bla*<sub>IMP-1</sub>, *aac*(6')-*IB-cr* の遺伝子カセットを有していた(図)。

パターン A インテグロンは 3 施設で分離された 28 株から検出され、菌株の属する PFGE グループおよび ST は複数に渡っていた(図)。また、プラスミドレプリコン遺伝子 *repH12*(*IncH12*) が 1 株を除いて検出された。

パターン B インテグロンについては施設 B のみの分離株(33 株)で検出された。また、当インテグロンは 31 株について *repA*(*IncW*) が同時に検出され、21 株については同一コンティグ上に存在した。2 株についてはパターン B インテグロンと同一コンティグ上にプラスミドレプリコン遺伝子 *repB*(*IncFIB*) が存在した。

CRE の効率的な検出方法に関する検討に供試したカルバペネマーゼ産生株(n=94)において、IMP, MEPM および LMOX に対して耐性を示した菌株がそれぞれ 9.6%, 14.9% および 87.2% であった。同様に、非感性を示す菌株がそれぞれ 17.0%, 31.9% および 96.8% であった(表 2)。

RAPIDEC CARBA NP において、GES 型カルバペネマーゼ産生株(n=3)を除いたすべてのカルバペネマーゼ産生株のカルバペネマーゼ産生性が確認された(陽性率:96.8%)。

シカベータテストにおいて、カルバペネマーゼ産生株のうち IMP 型のみ産生株(n=44)は 95.5% が MBL 産生株にカテゴライズされた。また IMP 型および CTX-M 型の両酵素を産生株(n=41)は、95.2% が複数の  $\beta$ -ラクタマーゼ産生もしくはクラス D に属するカルバペネマーゼの産生株にカテゴライズされた。NDM 産生株(n=1)も同様に、複数の  $\beta$ -ラクタマーゼ産生もしくはクラス D

に属するカルバペネマーゼの産生株にカテゴライズされた。また、KPC 産生株(n=3)、NMC-A 産生株(n=1)および OXA-48-like(n=1)産生株はいずれも AmpC 産生株にカテゴライズされた。GES 産生株はいずれもシカベータテスト陰性となった。

クイックチェイサー IMP において、IMP 産生株(n=85)はいずれも陽性となった(感度 100%)。その他の  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株(n=14)は陰性であった。

#### D. 考察

3 施設から分離された MBL 産生 *E. cloacae*(n=71)は IMP 耐性を示す菌株が 22.5% に留まっていたことから(表) IMP の MIC 値のみではこれらの菌株をスクリーニングすることは困難であると考えられた。CTX および LMOX に対しては全株が耐性を示したところから、スクリーニングのキードラッグにセファロスポリン系薬を使用の可能性が示唆された。CTX は CTX-M 型 ESBL によって高効率に不活化されてしまう一方、LMOX は ESBL および AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼに対して安定であるため、外来性 ESBL および染色体性 AmpC のいずれも除外出来、*Enterobacter* 属および *Citrobacter* 属菌などの MBL 産生株にも有用であると考えられた。

PFGE の結果、各グループには特定の施設の分離株が属しており、院内伝播が示唆された(図)。また、ST78 に属する菌株が施設から分離されていたことから、院内環境において成功しているクローンである可能性が示唆された。一部の菌株において、*bla*<sub>IMP-1</sub> 全長が検出されなかった理由として、NGS のリードカバレッジの不足が考えられた。

パターン A インテグロンは *IncH12* のプラスミド上に存在することが示唆され、これらは、複数の PFGE グループおよび ST に属する菌株から検出されたことから、*IncH12* プラスミドがパターン A インテグロンを媒介していると考えられた。

また、パターン B インテグロンはその多くは *IncW* プラスミド上に存在するが、同一のインテグロンが *IncFIB* プラスミド上に

も見出され、複数起源のプラスミドによって媒介されていることが明らかとなった。

CRE の効率的な検出方法の検討に供試した菌株 (n=99) のうち、CPE (n=94) の薬剤感受性検査成績では、IPM および MEPM に対する耐性率はそれぞれ 9.6% および 14.9% に留まった。一方、LMOX に対して耐性を示した CPE は 87.2% であり、本薬剤が IPM および MEPM に比較して CPE のスクリーニングに優れていることが示された。さらに、非感受性のカテゴリを用いると、CPE は耐性率 96.8%、MBL 産生株に限っては 100% であったことから、スクリーニング感度を向上させることが出来ると考えられた。

RAPIDEC CARBA NP は CPE における陽性率が 96.8% と非常に高感度であった。しかし、GES 型酵素産生株は本キットの基質である IPM に対する耐性を示したのにもかかわらず、検出できなかった。本キットは IPM の  $\beta$ -ラクタム環がカルバペネマーゼによって加水分解される際に生じる分解産物による pH の低下の検出を原理とするが、GES 型酵素の一部は IPM への親和性は高い一方、分解速度が非常に遅いため、規定の判定時間内に検出出来なかったと考えられた。

シカベータテストは IMP 産生株および IMP、CTX-M 型の両酵素産生株においては、95% 以上の精度で  $\beta$ -ラクタマーゼの産生性について正確に判定が可能であった。NDM 型酵素は本キットに採用されている MBL 阻害剤 (メルカプト酢酸ナトリウム) に阻害されにくい性質があるため、正確な判定が出来なかった。OXA-48-like 産生株が AmpC と判定されてしまった理由は不明であった。また、GES 型酵素は本キットの基質として採用されているセファロsporin 系薬の分解効率も非常に悪いため、GES 型酵素産生株はシカベータテスト陰性となったと考えられた。

クイックチェイサー IMP は IMP 型酵素産生株について検出感度が 100% であった。日本における MBL 産生株はほとんどが IMP 型であるため、本キットの使用は非常に有用であると考えられた。

## E. 結論

複数施設において院内伝播した IMP-1 産生 *E. cloacae* の分子疫学的解析から、院内環境において成功しているクローンの存在が示唆された。また、*bla*<sub>IMP-1</sub> が含まれるインテグロンは 2 パターンが確認され、それらは複数起源のプラスミドが媒介していることが明らかとなった。

また、LMOX に対して非感性を示す菌株に対して、市販キットのカルバペネマーゼ産生確認試験を行うことで、効率良く CPE の検出が可能であると考えられた。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 青木弘太郎、吉住あゆみ、杉田香代子、長谷川直樹、岩田敏、森屋恭爾、吉澤定子、石井良和、舘田一博：複数の医療施設から分離されたメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Enterobacter cloacae* に関する分子疫学的検討、第 24 回臨床微生物学会総会、2013 年 2 月 2 日、横浜
- 2) Kotaro Aoki, Ayumi Yoshizumi, Kayoko Sugita, Naoki Hasegawa, Satoshi Iwata, Kyoji Moriya, Sadako Yoshizawa, Yoshikazu Ishii, and Kazuhiro Tateda: A molecular epidemiological study of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Enterobacter cloacae* clinical isolated in Japan., The 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), September 6, 2014, Washington, DC
- 3) 今井和花、村上日奈子、湯本重雄、青木弘太郎、岩田守弘、榎園恭子、佐々木雅一、福澤滋、前原千佳子、安井久美子、吉住あゆみ、石井良和、舘田一博：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の効

率的な検出方法に関する検討、第 26 回  
日本臨床微生物学会総会・学術集会、  
2015 年 1 月 31 日、東京

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

表 1. IMP-1 産生 *E. cloacae* の薬剤感受性検査成績  
( $\mu\text{g/mL}$ )

抗菌薬	レンジ	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	耐性率(%)
IPM	$\leq 0.125-64$	2	8	22.5
CTX	16-512	256	>512	100
CFPM	1-512	32	128	52.1
AZT	0.25-512	16	256	54.9
PIPC/TAZ	2/4->512/4	32/4	256/4	29.6
LMOX	512->512	>512	>512	100
AMK	1-16	2	8	0
CPFX	0.25-64	2	64	46.5

#### 菌種内訳

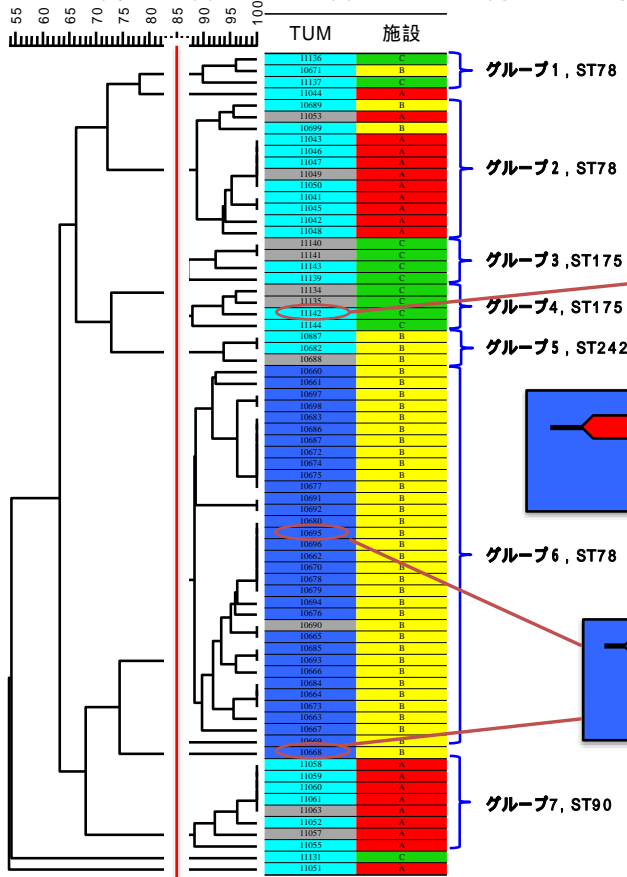
*Enterobacter* spp. : 55 株, *Escherichia coli* : 20 株, *Klebsiella pneumoniae* : 14 株, *K. oxytoca* : 10 株

表 2. 供試菌株が有する β-ラクタマーゼ遺伝子

	Ambler 分類	遺伝子型	菌株数
カルバペネマーゼ	B	IMP 型	44
	B および A	IMP 型 + CTX-M 型	41
	B	NDM 型	1
	A	KPC 型	3
	A	GES 型	3
	A	NMC-A 型	1
	D	OXA 型	1
ESBL	A	CTX-M 型	3
AmpC	C	AmpC	2
合計			99

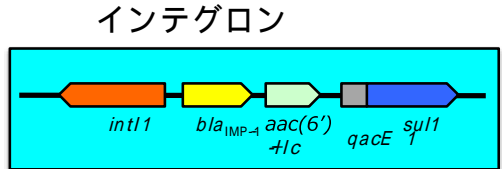
図. PFGE解析およびインテグロン解析結果

(%) Dice (Opt:1.50%) (ol 1.5% #1.5%) (ε>0 .0% S0 .0%) [0.0%-10 .0%]

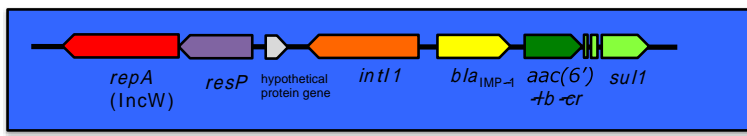


*bla*<sub>IMP-1</sub> の全長がアンティグとして検出された菌株 61/71

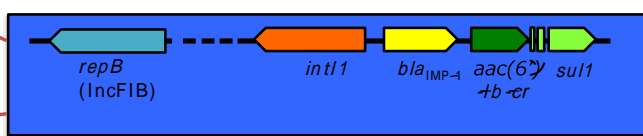
■ : 病院A  
■ : 病院B  
■ : 病院C



TUM11142以外の菌株からは *repH12* (IncH12) を検出 27/28



IncWの *repA* が同時に検出されな菌株: 31/33 (そのうち同一のアンティグに存在した菌株: 21/33)



IncFIBの *repB* が同一コティグに存在: 2/33 (TUM10668, TUM10695)

