

## 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 グラム陽性菌（腸球菌、黄色ブドウ球菌）の多剤耐性に関する研究

研究分担者 富田 治芳 （群馬大学医学系研究科・細菌学・教授）  
研究協力者 谷本 弘一 （群馬大学医学系研究科・薬剤耐性菌実験施設・准教授）

#### 研究要旨

この研究では、主要な院内感染症起因菌とされる多剤耐性のバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）、およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の薬剤耐性について研究を行った。臨床分離 VRE 株としてフランスで報告された新規の VanN 型 VRE を日本国内の環境中に見出し解析を行った。フランス臨床株と遺伝子型が類似する VanN 型 VRE 株が国内産鶏肉にも存在することを明らかにした。臨床分離 MRSA 株の各種抗 MRSA 薬に対する感受性試験では感受性に大きな変動は見られず、これまでと同等の治療効果が期待できることが示された。特にバンコマイシン高度耐性株の出現やバンコマイシン感受性低下傾向は認められず、また臨床で治療困難が指摘され問題と考えられている MIC 値 2 mg/L を示す株の多くは 1.5 mg/L であった。またグラム陽性耐性菌を含む多剤耐性菌に対し抗菌効果が期待されるホスホマイシン薬について、その耐性に関する研究を行い、細菌の二成分制御系を介する新たな耐性機構を明らかにした。

#### A. 研究目的

日本で増加中のバンコマイシン耐性腸球菌 VRE に関する耐性機構の解析、伝播・拡散機構の解明、分子疫学研究は国内では十分に行われていない。本研究では国内で分離される VRE について解析しその情報を発信し、国内の医療施設における VRE の院内感染予防対策に寄与する。

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA の治療薬として使用される各種抗菌薬（抗 MRSA 薬）の感受性動向調査が組織的には行われていないため、治療薬選択、投与方法について臨床現場で混乱が生じている。組織的かつ高精度管理の下、MRSA の薬剤感受性試験を行い、科学的根拠に基づく正確で適切な耐性菌情報を臨床へ発信することを

#### 目的とする。

耐性グラム陽性細菌を含む各種耐性菌に対する治療薬として、古典的だが他の抗菌薬とは作用機構が異なるホスホマイシンの抗菌効果が再び注目されている。今後、ホスホマイシンの使用量の増加に伴いホスホマイシン耐性が临床上重要な問題となることが予想される。今回、このホスホマイシン耐性に関する研究を行った。

#### B. 研究方法

国内で分離された臨床分離 VRE 株、MRSA 株について収集し、各種薬剤に対する感受性検査、および耐性遺伝子の分子遺伝学的解析を行った。VRE に関してはヒトへの伝播拡散の一要因とされる環境（食肉）由来株についても解析を行った。さらに VRE よ

る国内最初の院内感染アウトブレイク事例の VRE 株が生産する新規バクテリオシンの生化学的解析を行った。ホスホマイシンの新たな耐性機構の研究として、最も研究が進み、多くの知見の積重ねがある大腸菌をモデル細菌として用い、遺伝学的解析を行った。

#### 倫理面への配慮

全ての臨床分離株は患者個人を同定できる情報を含まない検体として収集し、本研究に用いた。

#### C. 研究結果

未知の Van 型 VRE (*E. faecium*) 株を国内産鶏肉から分離し、解析の結果、フランスの臨床分離株として報告された VanN 型 VRE と同一型であり、世界で 2 例目の株として報告した。<sup>1)</sup> さらに類似の VanN 型 VRE 株が過去においても複数の食肉検体から分離されていたことを明らかにした。しかし、過去に国内で収集した臨床分離株には VanN 型耐性遺伝子を持つ株は存在せず、また腸球菌の染色体遺伝子型も異なっていた。<sup>2)</sup> 一方、VRE を含め臨床から分離される腸球菌株の約 6 割が保持している抗菌物質である新規バクテリオシン Bac41 の詳細な分子機序の解析を行った。Bac41 が細胞壁溶解酵素型バクテリオシンであり、構成する BacL1 蛋白は腸球菌の細胞壁ペプチドグリカン内の L-Ala-L-Ala 架橋構造を認識し、D-iGlu-L-Lys 間でペプチド鎖を切断することを明らかにした。<sup>3), 6)</sup>

これまでに収集した臨床分離 MRSA 株 (2004 年, 2008 年, 2011 年, 2012 年, 2013 年分離の合計 3,576 株) の各種抗 MRSA 薬 (バンコマイシン、テイコプラニン、リネゾリド、アルベカシン、キノプリスチン・ダルホプリスチン) の MIC 値に明らかな変動は認めなかった。またバンコマイシン高度耐性株、感受性の低下傾向も認めなかった。バンコマイシンの MIC 値 2 mg/L の株を詳細に調べたところ、その大部分は 1.5 mg/L であった。

細菌の細胞壁合成の最初のステップを阻

害するというユニークな抗菌作用を持つホスホマイシンの薬剤耐性に関する耐性機構について解析を行い、細菌が持つ 2 つの二成分制御系 (CpxAR 遺伝子と TorSRT 遺伝子) を介する薬剤透過性 (ホスホマイシンの取り込み能) の低下がホスホマイシン耐性に関与していることを明らかにした。<sup>4), 7)</sup>

#### D. 考察

VanN 型 VRE (*E. faecium*) は 2011 年にフランスの臨床株として初めて報告された新規の Van 型 VRE である。今回、日本の環境中 (複数の食肉検体) から同一型 VRE を分離した。レトロスペクティブな解析の結果、VanN 型 VRE は 2009 年に収集された食肉検体に既に存在しており、一部の株で、宿主の遺伝型はフランスの臨床分離株と類似しており遺伝的な関連性を認めた。これらの結果は、新規 VanN 型 VRE は既に環境中に拡散していることを示唆している。VRE の新規バクテリオシンが細胞壁溶解酵素型バクテリオシンであることを初めて明らかとした。

国内で臨床分離される MRSA 株の各種抗 MRSA 薬の感受性に大きな変動は無かったことから、細菌学的には臨床効果が期待できることが示された。特に臨床で最も多く用いられているバンコマイシンの MIC 値の上昇傾向や、バンコマイシン高度耐性株は存在せず、また治療困難とされる MIC 値 2 mg/L の株は少数であったことからバンコマイシンの治療効果は以前と同等であることが期待される。

細菌にはホスホマイシン耐性に関わる二成分制御系が存在することから、これらの働きを考慮した効果的な抗菌薬投与法の考案、あるいはこれらの制御系を阻害するような新規薬剤の開発が求められる。<sup>2)</sup>

#### E. 結論

新規 VanN 型 VRE を国内産食肉から複数株を分離した。国内の臨床分離 MRSA 株の抗 MRSA 薬の感受性分布に明らかな変動は無く、多くの株が感受性を示した。収集株にバンコマイシン耐性 MRSA 株は存在しなかった。

多剤耐性菌の治療薬として再評価されているホスホマイシンの投与には耐性機序を考慮した適正な使用が望まれる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nomura T, Tanimoto K, Shibayama K, Arakawa Y, Fujimoto S, Ike Y, Tomita H. Identification of VanN-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolate from chicken meat in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56:6389-6392, 2012.
- 2) Hirakawa H, Tomita H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Frontier Microbiology*. 4:114, 2013.
- 3) Kurushima J, Hayashi I, Sugai M, Tomita H. Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* is a peptidoglycan D-isoglutamyl-L-lysine endopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 288:36915-36925, 2013.
- 4) Kurabayashi K, Hirakawa Y, Tanimoto K, Tomita H, Hirakawa H. Role of CpxAR two-component signal transduction system in control of fosfomycin resistance and carbon substrate uptake. *Journal of Bacteriology*. 196:248-256, 2014.
- 5) Kudo M, Nomura T, Yomoda S, Tanimoto K, Tomita H. Nosocomial infection caused by vancomycin-susceptible multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* over a long period in a university hospital in Japan. *Microbiology Immunology*. 58:607-614, 2014.
- 6) Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, Tomita H. Bacteriocin protein BacL<sub>1</sub> of

*Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala<sup>2</sup>-crossbridged peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*. 197:286-295, 2015.

7) Kurabayashi K, Hirakawa Y, Tanimoto K, Tomita H, Hirakawa H. Identification of a second two-component signal transduction system that controls fosfomycin tolerance and glycerol-3-phosphate uptake. *Journal of Bacteriology*. 197:861-871, 2015.

##### 2. 学会発表

- 1) 野村隆浩、柴山恵吾、荒川宜親、池康嘉、富田治芳 . VanN 型バンコマイシン耐性腸球菌の解析 . 第 86 回日本細菌学会総会 . 2013 年 3 月 20 日 千葉 .
- 2) 久留島潤、富田治芳 . 腸球菌が生産する二成分性バクテリオシン Bac41 の溶菌作用機序の解析 . 第 86 回日本細菌学会総会 . 2013 年 3 月 20 日 千葉 .
- 3) 富田治芳、谷本弘一、山田景子、荒川宜親 . 臨床分離黄色ブドウ球菌株の各種抗 MRSA 薬に対する感受性の動向調査 . 第 96 回日本細菌学会関東支部総会 . 2013 年 10 月 31 日 東京 .
- 4) 富田治芳 . VRE, PRSP, GBS の現状 . 耐性菌シンポジウム 2013 . 平成 25 年 12 月 21 日 東京
- 5) 富田治芳 . 黄色ブドウ球菌に対するバンコマイシン MIC 変動の実態とその分子メカニズム . 第 25 回日本臨床微生物学会総会 . 2014 年 2 月 2 日 名古屋 .
- 6) 野村隆浩、谷本弘一、富田治芳 . 日本で分離された VanN 型 VRE について . 第 25 回日本臨床微生物学会総会 . 2014 年 2 月 2 日 名古屋 .
- 7) Tomita H, Tanimoto K. Analysis of the pMG1-like highly conjugative plasmids. 4th ASM Conference on Enterococci. March 5-7, 2014 Cartagena, Colombia.
- 8) Kurushima J, Tomita H. Analysis of bacteriocin 41 of *E. faecalis*. 4th

ASM Conference on Enterococci . March 5-7, 2014 Cartagena, Colombia.

- 9) Nomura H, Tomita H. Analysis of VanN-type vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolates in Japan. 4th ASM Conference on Enterococci. March 5-7, 2014 Cartagena, Colombia.
- 10) 久留島潤、林幾江、中根大介、西坂崇之、菅井基行、富田治芳 . 腸球菌バクテリオシン Bac41 による殺菌メカニズムの解析 . 第 87 回日本細菌学会総会 . 2014 年 3 月 26 日 東京 .
- 11) 野村隆浩、柴山恵吾、荒川宜親、谷本弘一、富田治芳 . 日本の VanN 型 VRE について . 第 87 回日本細菌学会総会 . 2014 年 3 月 27 日 東京 .
- 12) 平川秀忠、倉林久美子、平川裕子、谷本弘一、富田治芳 . 二成分情報伝達系による腸管出血性大腸菌のホスホマイシン抵抗性と炭素源獲得の可逆的制御 .

第 87 回日本細菌学会総会 . 2014 年 3 月 27 日 東京 .

- 13) 富田治芳、谷本弘一 . バンコマイシン耐性 MRSA の現状 . 三学会 ( 化学療法学会西日本、感染症学会中日本、西日本 ) 合同学術集会 . 2014 年 10 月 24 日 岡山 .
- 14) 野村隆浩、谷本弘一、富田治芳 . 新たに日本で分離された VanN 型 VRE について . 第 26 回日本臨床微生物学会総会 . 2015 年 2 月 1 日 東京 .
- 15) 谷本弘一、野村隆浩、富田治芳 . 群馬県内の医療施設で分離された CA-MRSA について . 第 26 回日本臨床微生物学会総会 . 2015 年 2 月 1 日 東京 .

#### 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