

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告書

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制の強化に関する研究

結核菌の薬剤耐性 Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (Taiwan CDC)
NDM-1 型薬剤耐性菌 NDM-1 carbapenemase-producing bacteria (Vietnam NIHE)

研究分担者(担当責任者) 柴山 恵吾 (国立感染症研究所 細菌第二部 部長)

研究要旨

現在、世界各国で様々な薬剤耐性菌が拡散し公衆衛生上大きな問題になっている。台湾 CDC とは、結核菌の薬剤耐性に関する共同研究を行っている。これまでに台湾で分離されたイソニアジド(INH)耐性結核菌で、既知の遺伝子変異を持たない株 1 1 株を見出し、感染研で全ゲノムを決定し、SNP 解析を行った。その結果、Mycobacterial membrane protein Large の遺伝子 (mmpL 遺伝子) に 10 カ所の新規の変異を見出した。今後、これらの変異蛋白の機能を解析し、実際に耐性に関与しているかどうかを解析する。そして INH 耐性結核菌を検出する検査法の改良を目指す。アジアの結核罹患率の高い国で薬剤耐性結核の迅速診断に役立つことが期待される。ベトナム NIHE とは、世界的に増加が問題となっているカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; CRE) に関する共同研究を行っている。ベトナムの医療機関から腸内細菌科細菌 4,096 株を収集し、薬剤耐性を調べたところ 69 株 (1.7%) がカルバペネム耐性だった。69 株のうち 47 株 (68%) で NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子が検出され、うち 5 株は OXA-48 型カルバペネマーゼ遺伝子も保有していた。その他、6 株 (9%) で OXA-48 型カルバペネマーゼ遺伝子、1 株 (1%) で KPC 型カルバペネマーゼ遺伝子が検出され、14 株 (20%) は検出を試みたカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。NDM 型カルバペネマーゼ遺伝子を含むプラスミドのサイズは、50kb ~ 150kb と様々であり、Inc type は、Inc FII_s、IncA/C、IncN、non typable が含まれた。NDM 型、KPC 型、OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌は、日本においてはこれまで輸入事例を中心に数十例ほど報告があるのみだが、ベトナムにおいては医療機関で頻りに分離されている。海外からの帰国症例の場合は、NDM 型のような日本で分離が少ない耐性遺伝子が検出される可能性も念頭におくことが重要と考えられた。

研究協力者

森 茂太郎 (国立感染症研究所・細菌第二部)
金 玄 (国立感染症研究所・細菌第二部)
松井 真理 (国立感染症研究所・細菌第二部)
鈴木 仁人 (国立感染症研究所・細菌第二部)
鈴木 里和 (国立感染症研究所・細菌第二部)
筒井 敦子 (国立感染症研究所・細菌第二部)

A. 研究目的

薬剤耐性結核菌は世界の深刻な社会問題の一つである。治療薬であるイソニアジド(INH)に対する耐性菌はよく分離されるが、耐性は *katG*、*ndh* などの遺伝子の変異による。これらの変異を標的とした DNA プローブによる迅速検出法が実用化されているが、台湾 CDC では、その DNA プローブに含まれない変異を持つ耐性株が分離されている。台湾 CDC との共同研究では、台湾 CDC で収集されたこれらの株を用いて感染研で新たな遺伝子変異を見出すとともに、それらの変異が実際に耐性に関与しているかどうかについても感染研で解析することとし

た。

また、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; CRE) については、世界的に増加しており、臨床上大きな問題となっている。2008 年にインドで見出された NDM 型カルバペネマーゼ産生菌は、数年の間に急速に世界中へ広がった。ベトナムでは、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌の分離は多く、医療機関のみならず環境中にも広く分布することが報告されている。一方、NDM 型カルバペネマーゼ産生菌の日本での分離はごく少ないが、分離された症例のほとんどに海外渡航歴、特に海外の医療機関受診歴があった (Table 1)。本研究では、ベトナムの医療機関で分離された NDM 型カルバペネマーゼ産生菌の分子疫学解析をベトナム NIHE と共同で実施し、今後日本に持ち込まれる可能性がある薬剤耐性菌の情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

台湾 CDC から送付された、既知の遺伝子変異を持たない 11 株の INH 耐性結核菌のゲノム DNA を抽出した後、次世代シーケンサーによりゲノム解析を行った。得られたゲノム情報に基づいて、

Mycobacterium tuberculosis H37Rv 株をレファレンス株とした SNP 解析を行い、変異箇所を同定した。

2010年8月から2012年12月にベトナム ハノイの医療機関で腸内細菌科細菌を収集しカルバペネム耐性を調べた。カルバペネム耐性が確認された69株について、PCR法でラクタマーゼ遺伝子を同定した。NDM型カルバペネマーゼ遺伝子が検出された株については、S1-PFGEとSouthern blot法によりNDM型カルバペネマーゼ遺伝子を含むプラスミドバンドサイズを決定した。PCR-based replicon typingによりプラスミドをタイピングした。また、2010年から2014年11月にかけて国立感染症研究所細菌第二部に日本国内の医療機関から送付された株のうちNDM型カルバペネマーゼ遺伝子が検出された19株のカルバペネム系薬剤に対する感受性を調べた。

倫理面への配慮 該当なし。

C. 研究結果

台湾で分離されたINH耐性結核菌のゲノムのSNP解析の結果から、INH耐性に関わることがこれまでに報告されている遺伝子上で新しい変異を16カ所同定した。特にINH耐性に重要な*katG*遺伝子と*ndh*遺伝子上でそれぞれ5カ所と1カ所の新規変異を見出した (Table 2)。一方で、*katG*遺伝子や*ndh*遺伝子上などに変異がないINH耐性株も存在した。そこで、INH耐性に関わる遺伝子として新たにMycobacterial membrane protein Large (*mmpL*) をコードしている遺伝子 (*mmpL* 遺伝子) に着目してSNP解析を行った。その結果、10カ所の新しい変異を同定した (Table 3)。

ベトナムの医療機関で分離された腸内細菌科細菌4,096株のうち、69株(1.7%)がCREだった。69株のうち47株(68%)でNDM型カルバペネマーゼ遺伝子が検出され、うち5株はOXA-48型カルバペネマーゼ遺伝子も保有していた。その他、6株(9%)でOXA-48型カルバペネマーゼ遺伝子、1株(1%)でKPC型カルバペネマーゼ遺伝子が検出され、14株(20%)は検出を試みたカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった (図1)。NDM型カルバペネマーゼ遺伝子を含むプラスミドのサイズは、50kb~150kbと様々であり、Inc typeは、Inc FIIIs、IncA/C、IncN、non typable が含まれた。また、NDM型検出株47株のうち、イミペネムに非感性(MIC 2 μ g/ml以上)の株は87%、メロペネムに非感性(MIC 2 μ g/ml以上)の株は83%を占めた。

日本の医療機関で分離されたNDM型カルバペネマーゼ産生株19株のイミペネム、メロペネムMIC分布を図2に示す。全て2 μ g/ml以上であるものの、イミペネムのMICがメロペネムより低い傾向が見られた。

D. 考察

今回SNP解析を行ったINH耐性結核菌で見出された*katG*遺伝子の新規変異は、INH耐性と関わっていることが示唆された。また、*katG*遺伝子や*ndh*遺伝子上に変異が存在しない株では、*mmpL*遺伝子上に変異が見られた。*mmpL*は結核菌において細胞壁構造の形成に重要な役割を果たしていることから、この*mmpL*がINHの作用機序に関わっており、かつINH耐性に*mmpL*遺伝子の変異が関わっていることも考えられた。これらの知見は、新しいDNAプローブを用いたINH耐性結核菌の迅速検出法の開発に寄与することが期待される。

カルバペネマーゼ遺伝子の分布は、国によって異なることが知られているが、ベトナムの医療機関で分離されたCREのカルバペネマーゼ遺伝子として、NDM型が最も多く検出され、日本で多いIMP型は検出されなかった。同一医療機関分離株であってもNDM型カルバペネマーゼ遺伝子を含むプラスミドのサイズやInc typeは様々であり、既にベトナム国内にNDM型カルバペネマーゼを含む様々なタイプのプラスミドを有する株が広がっていることが示唆された。

NDM型カルバペネマーゼ産生株のカルバペネム系抗菌薬に対するMIC値は、ベトナム分離株、感染研保有株ともにMIC 2 μ g/ml以上の株が多かったが、イミペネムのMIC値がメロペネムに比べてやや低い傾向が見られた。

E. 結論

INH耐性結核菌を用いたSNP解析結果より、INH耐性に関わると予想される新規遺伝子変異を見出した。

ベトナム国内には、NDM型カルバペネマーゼを含む様々なタイプのプラスミドが既に広がっていることが示唆された。海外からの帰国症例の場合は、NDM型のような日本で分離が少ない耐性遺伝子が検出される可能性も念頭に検査を行うことが重要と考えられた。

F. 健康危機情報

海外で入院歴のある患者を受け入れる場合には、海外で蔓延しているNDM型などの耐性菌を保菌している可能性を念頭に置き、感染対策に十分注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Common isolation of New Delhi metallo- β -lactamase 1-producing Enterobacteriaceae in a large surgical hospital in Vietnam.
Hoang TH, Ehsani S, Shibayama K, Matsui M, Suzuki S, Minh BN, Duong NT, Phuong VT, Linh DT, Thu HN, Anh DD, Son HT, Hien NT, Wertheim H. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, in press.

2) 外来型カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の
検出状況
鈴木里和、松井真理、鈴木仁人、柴山恵吾 病原微
生物検出情報 (IASR) 35(12):287-288

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。

Table 1 国立感染症研究所細菌第二部に送付された NDM 型カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌
(2010年~2014年11月)

カルバペネマーゼ型	送付施設数	菌種(株数)	海外渡航先
NDM 型	16	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (12) <i>Escherichia coli</i> (13)	インド、インドネシア、 バングラデシュ、スリラ ンカ、中国、ベトナム

Table 2. これまでに INH 耐性との関連が報告されている
遺伝子において新たに見出した変異

Mutation		
Gene	Nucleotide No.	Amino Acid
<i>Rv1592c</i>	963_964delAAinsGG	Glu321_Ile322delinsGluVal
<i>ndh</i>	T→C position 203	Ile68Thr
<i>katG</i>	G and A inserted after position 235	Frameshift
<i>katG</i>	G→A position 332	Gly111Asp
<i>katG</i>	C→A position 1436	Ala479Glu
<i>katG</i>	C→A position 1683	His561Gln
<i>katG</i>	G→A position 2135	Gly712Asp
<i>Rv1909c</i>	A→G position 109	Thr37Ala
<i>Rv2247</i>	G→A position 19	Glu7Lys
<i>Rv3795</i>	A→G position 916	Met306Val
<i>Rv3795</i>	A→C position 1061	Asp354Ala
<i>Rv3795</i>	G→A position 1216	Gly406Ser
<i>Rv3795</i>	A→G position 1490	Gln497Arg
<i>Rv3795</i>	A→G position 1693	Ser565Gly
<i>Rv3795</i>	G→C position 1807	Gly603Arg
<i>Rv3795</i>	A→A position 3070	Asp1024Asn

Table 3. *mmpl* 遺伝子において新たに見出した変異

Mutation		
Gene	Nucleotide No.	Amino Acid
<i>mmpl1</i>	G→T position 2722	Val908Phe
<i>mmpl3</i>	G→A position 233	Gly78Asp
<i>mmpl3</i>	A→C position 1003	Ile335Leu
<i>mmpl5</i>	G→A position 736	Gly246Ser
<i>mmpl5</i>	G→A position 2299	Asp767Asn
<i>mmpl6</i>	C→G position 473	Ala158Gly
<i>mmpl8</i>	G→A position 1603	Ala535Thr
<i>mmpl11</i>	C→A position 1560	Phe520Leu
<i>mmpl11</i>	C→T position 2122	His708Tyr
<i>mmpl12</i>	T→G position 509	Val170Gly

図1 ベトナムハノイの医療機関で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科 (CRE) 69 株のカルバペネマーゼ遺伝子検出

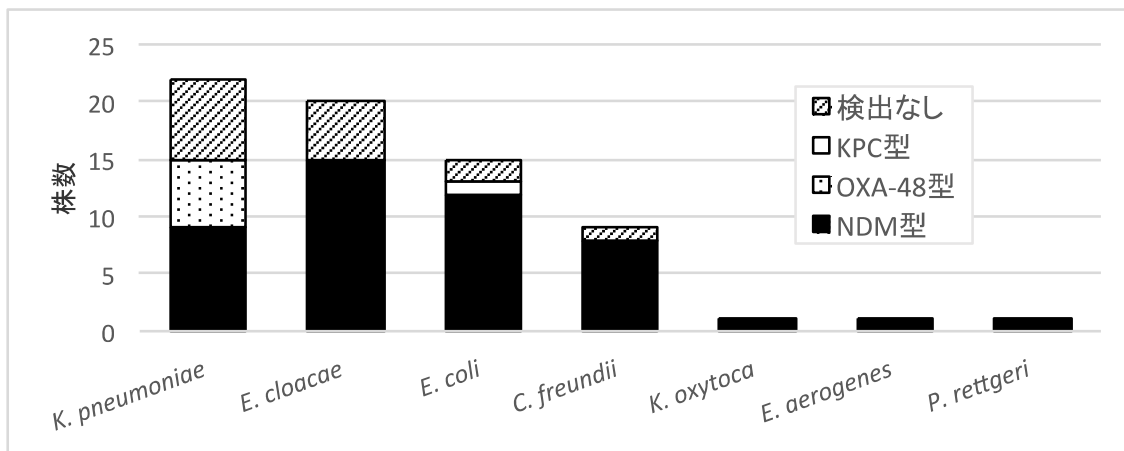


図2 NDM 型カルバペネマーゼ産生株におけるイミペネム、メロペネムの最小発育阻止濃度 (MIC) 分布 (感染研保有株)

