

分子疫学的情報を活用した薬剤耐性菌対策地域連携に関する研究

研究分担者 八木 哲也 名古屋大学大学院 医学系研究科 臨床感染統御学 教授

研究要旨

愛知県で行っている感染制御の地域連携ネットワークにおいて2014-2017年に収集された、カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* 株 15 株とユニークなカルバペネム耐性を示す *E. cloacae complex* 株 4 株を用い、その耐性因子の同定、MLST による分子疫学解析、NGS 法によるプラスミド解析を行った。前者では耐性因子は IMP-1 産生株 12 株、IMP-6 産生株 3 株で、施設間で同じ MLST の株が検出される事例が 2 事例あり、類似のプラスミドを持つ異なる MLST 株が同一施設から検出される事例が 1 事例見つかった。こうした結果をフィードバックして、地域での感染制御の連携に活用することは有意義であると考えられた。後者ではカルバペネム耐性は IMI-9 産生によるものであり、共通の MLST を示したが、*E. cloacae complex* の亜種同定までは至らなかった。

A. 研究目的

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE：Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae）をはじめとする多剤耐性菌の拡がり、我が国でも問題となりつつある。厚生労働省の JANIS からの報告では、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌の菌種やカルバペネマーゼの疫学は地域でから里異なることが知られている。多剤耐性菌の感染制御のための地域連携で足並みを揃えて対策をとるためには、それぞれの地域での疫学を詳細に検討する必要がある。本研究の目的は、感染制御の地域連携において各施設から収集した菌株を用いて、プラスミド解析を含めた詳細な菌の解析を行い、その情報が感染対策の地域連携に活用できるかを検討することである。

B. 研究方法

1) 地域連携で収集されたカルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* 株の検討
当院での倫理審査を通じたのち、2014 年か

ら 2017 年の間に地域連携で収集されたカルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* 15 株について MinION, そして MiSeq を用いて NGS 解析を行い、それぞれが持つプラスミドを解析すると共に、Multi Locus Sequence Typing (MLST) を行った。

2) ユニークな感受性パターンを示す *E. cloacae complex* 株の検討

名大病院を含む 3 施設から、Meropenem, Imipenem に高度耐性であるが、ペニシリン系、セファロsporin系薬に感受性を示す *E. cloacae complex* 株が 4 株見つかった。これらの株についてその耐性機序、MLST、亜種同定などを行った。

C. 研究結果

1) 地域連携で収集されたカルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* 株の検討
2014-2017 年の間に、地域連携にて収集された第 3 世代又は第 4 世代セファロsporin薬

が耐性で、かつセフメタゾールに耐性の *K. pneumoniae* 株の中で、表現型検査によってカルバペネマーゼ産生が疑われ、PCR でカルバペネマーゼ遺伝子の存在が確定された 23 株のうち施設と検出年度の重なりを除いた 15 株を解析に使用した。カルバペネマーゼ遺伝子は 12 株で IMP-1, 3 株で IMP-6 であった。IMP-6 は 2 病院から検出されており、IncN プラスミドにのっており、アミノグリコシド修飾酵素や、CTX-M-35, SHV-26 などの ESBL 遺伝子も同時に検出され、関連していることが疑われた。MLST 解析では 2 株は ST592 で同一で、異なる施設から検出されていた。一方で、IMP-1 産生株では今回の解析だけではプラスミド型は不明だが、IncFIB(K), 及び IncFII(K) が多い傾向にあった。MLST 解析では、ST37 が同一施設から 3 株、ST517 が 2 施設から 4 株検出されていた。

Hospital	Year	Genotype	Plasmid	MLST
A	2014	aac(3)-IIa, aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA2, aadA5, aph(3)-Ia, blaIMP-1, blaSHV-11, blaTEM-1B, dfrA12, fxaA6, mph(A), qcrA, qcrB, sul1	Col156, FII(gBK30883), IncFIB(K)	37
A	2015	aac(3)-IIa, aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA2, aadA5, aph(3)-Ia, blaIMP-1, blaSHV-155, blaTEM-1B, catA1, dfrA12, fxaA6, mph(A), qcrA, qcrB, sul1	FII(gBK30883), IncFIB(K)	37
A	2017	aac(3)-IIa, aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA2, aadA5, blaIMP-1, blaSHV-11, blaTEM-1B, catA1, dfrA12, fxaA6, mph(A), qcrA, qcrB, sul1	FII(gBK30883), IncFIB(K)	37
A	2018	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA5, blaIMP-1, blaSHV-11, fxaA6, qcrA, qcrB	FII(gBK30883), FII(gBK30883), IncFII(K)	2158
B	2018	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA5, blaIMP-1, blaSHV-11, fxaA6	Col440L, Col440L, Col440L, Col440L, FII(gBK30883), FII(gBK30883), IncFIB(K), IncFIB(gOII), IncFII(K)	New
C	2014	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA2, blaCTX-M-35, blaIMP-4, blaSHV-27, fxaA, qcrA, qcrB, qnrS1, sul1	IncFIB(K), IncFII(K), IncN	New
E	2016	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA2, blaCTX-M-35, blaIMP-4, blaSHV-28, fxaA5, sul1, tet(A)	Col440L, IncFIB(K), IncN1B, IncN	592
C	2016	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA2, blaCTX-M-35, blaIMP-4, blaSHV-28, fxaA5, sul1, tet(A)	IncFIB(K), IncN1B, IncN	592
F	2016	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, blaCTX-M-14, blaIMP-1, blaSHV-27, dfrA1, fxaA, qcrA, qcrB, qnrS1, sul1, tet(A)	IncFIB(K), IncFII, IncN	New
F	2017	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, blaCTX-M-14, blaIMP-1, blaSHV-27, dfrA1, fxaA, qcrA, qcrB, qnrS1, sul1, tet(A)	IncFIB(K), IncFII, IncN	716
G	2018	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, blaIMP-1, blaSHV-11, fxaA6, qcrA, qcrB	Col440L, IncFIB(K), IncFII(K)	461
B	2017	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA5, blaIMP-1, blaSHV-11, fxaA6	Col440L, FII(gBK30883), IncFIB(K), IncFII, IncFII(K), IncP1	517
E	2017	aac(3)-IIa, aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA5, aph(3)-Ia, aph(6)-Ia, blaCTX-M-3, blaIMP-1, blaSHV-11, blaTEM-1B, fxaA6, qnrS1, sul2	Col440L, IncFIB(K), IncFII(K), IncL/M	517
B	2014	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA5, aph(3)-Ia, aph(6)-Ia, ARR-3, blaCTX-M-3, blaIMP-1, blaSHV-11, blaTEM-1B, dfrA14, fxaA6, qnrS1, sul2	Col440L, FII(gBK30883), IncFIB(K), IncFII(K), IncN, IncU	517
B	2018	aac(8)-Ib-cr, aac(9)-Ib-Hangzhou, aadA5, aph(3)-Ia, aph(6)-Ia, ARR-3, blaCTX-M-3, blaIMP-1, blaSHV-11, blaTEM-1B, dfrA14, fxaA6, qnrS1, sul2	Col440L, FII(gBK30883), IncFIB(K), IncFII(K), IncN, IncU	517

表 1 カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* 株の解析結果

2) ユニークな感受性パターンを示す *E. cloacae complex* 株の検討

名大病院を含む地域連携施設 3 施設から検出されたカルバペネム系薬に耐性を示し、ペニシリン系及びセファロsporin系薬に感受性となる *E. cloacae complex* 株 4 株を解析したところ、4 株は全て IMI-9 産生株であり、同じ MLST であることが判明した (表 2)。

	Sequ nce Type	dna A	fus A	gyr B	leu S	pyr G	rpl B	rpo B
A	New	~246	28	124	32	30	~8	29
B	New	~246	28	124	32	30	~8	29
C	New	~246	28	124	32	30	~8	29
D	New	~246	28	124	32	30	~8	29

表 2 : 4 株の MLST

また菌種による検討では、既報のゲノムデータとの比較では、*E. asuburiae* が最も近縁であるが、OrthoANI 値で 92%程度であった。さらに菌種を増やして解析中である。

D. 考察

薬剤耐性菌対策は、各医療機関で行うレベルと地域での連携を活かして足並みを揃えた対策をとるレベルがあると考えられ、それがイスラエルでの国を挙げた対策においてよく示されている。(Infect Control Hosp Epidemiol 38:580-594, 2017.表 3,4)

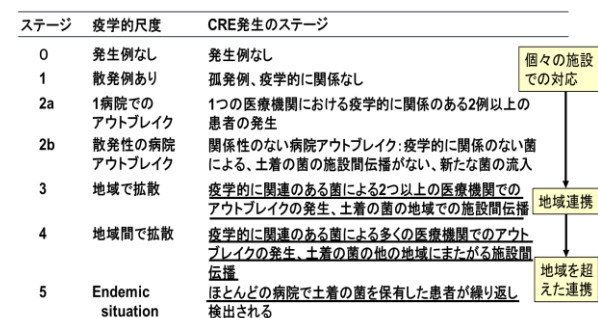


表 3 疫学的尺度と CRE 発生のステージ (イスラエル) (Adapted from ICHE 2017; 38: 580-594.)

我が国では、感染防止対策加算の中に感染防

止地域連携加算も加えられているが、基本的には加算 1 の施設と加算 2 の施設の連携で、地域での足並み揃えた対策連携などは視野に入っていない。

Step1	CREが検出されていなかったかを確認	Stage 0
Step2	発生した病棟と医療機関内での伝播を同定する	Stage 1
Step3	早期にCREを検出し、封じ込め策を実施する	Stage 2a
Step4	感染対策をさらに強化する ・医療従事者の教育 ・患者の転送・移送の制限 ・環境表面の消毒 ・外来診療での衛生対策強化 ・侵襲的デバイスの使用を医学的に許されるレベルまで最小限にする	Stage 2b
Step5	地域連携ストラテジー ・スクリーニングプロトコルを決める ・感染対策の内容を標準化する ・抗菌薬適正使用支援 ・地域での細菌検査室の検査能力を把握する ・Reference laboratoryを立ち上げる ・CRE検出の報告を義務化 ・サーベイランスデータ収集を中央化し、コミュニケーションを図る ・国際的ネットワークを活用	Stage 3,4
Step6	市中でのCREの拡散を調査する	Stage 5

表 4：Stage に即した対策（イスラエル）

イスラエルのような足並み揃えた対策をとろうとすれば、耐性菌の分子疫学的情報が、地域での蔓延のステージを決定するのに必須となる。今回解析したカルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* の分子疫学では、IMP-1 及び IMP-6 産生株において同じ MLST の株が、2 施設で検出されていた。地域における拡がりやすく優勢となるクローンの出現の兆しを示すものである可能性もあり注目すべきと考えられた。プラスミド解析では、IMP-1 及び IMP-6 はインテグロン構造に乗っており、アミノグリコシド修飾酵素遺伝子などに関連があるものと推定された。IMP-6 が検出された株では、同じような構造のプラスミドが異なる MLST の株に存在しており、プラスミドの伝播も示唆された。その他に関連が示唆された ESBL 遺伝子については、どのような遺伝的背景にあるのか、今後さらに詳細な解析を行う予定である。

カルバペネム系薬にのみ高度耐性を示し、ペニシリン系、セファロスポリン系薬には感受性を示す *E. cloacae complex* 株 4 株の解析では、これらの株がすべて IMI-9 産生株であり、同じ MLST を示すことが明らかになった。既報の全ゲノムとの比較で最も近縁であったのが *E. asuburiae* であったが、同じ亜種と同定す

るには OrthoANI 値が低く (>95% 必要)、今後さらに解析を進めることとした。

E. 結論

愛知県で行っている感染制御の地域連携ネットワークにおいて収集された、カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* 株 15 株とユニークなカルバペネム耐性を示す *E. cloacae complex* 株 4 株を用い、その耐性因子や分子疫学、プラスミド解析を行った。前者では IMP-1 産生株は 12 株、IMP-6 産生株は 3 株で、施設間で同じ MLST の株が検出される事例が 2 事例あり、類似のプラスミドを持つ異なる MLST 株が同一施設から検出される事例が 1 事例見つかった。後者ではカルバペネム耐性は IMI-9 産生によるものであり、共通の MLST を示したが、*E. cloacae complex* の亜種同定までは至らなかった。今後さらに解析を進める予定である。また、こうした結果をフィードバックして、地域での感染制御の連携に活用することは有意義であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tetsuka N, Hirabayashi A, Matsumoto A, Oka K, Hara Y, Morioka H, Iguchi M, Tomita Y, Suzuki M, Shibayama K, Yagi T. ; Molecular epidemiological analysis and risk factors for acquisition of carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae complex* in a Japanese university hospital. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. Jul 24;8:126 1-10, 2019.

2. 学会発表

- 1) Tetsuka N, Iguchi M, Matsumoto A, Oka K, Morioka H, Tomita Y, Yagi T. ;

Molecular epidemiology and acquisition risk factor of carbapenemase-producing

Enterobacter cloacae complex. 第93回日本感染症学会総会・学術講演会, 2019.4.4-6, 名古屋

- 2) 八木哲也；薬剤耐性菌対策としての感染対策地域連携活動. 教育講演, 第93回日本感染症学会総会・学術講演会, 2019.4.4-6, 名古屋
- 3) 八木哲也；薬剤耐性グラム陰性菌感染症の制御に向けてー抗菌薬適正使用と感染対策一. 教育セミナー, 第31回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 20200131-0202, 金沢
- 4) 八木哲也；地域連携活動面から, 多剤耐性菌制御委員会企画(シンポジウム), 第35回日本環境感染学会総会・学術集会, 20200214-15, 横浜

G. 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