

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 臨床感染統御学分野 教授

研究要旨

地域連携サーベイランスで収集したカルバペネマーゼ産生 *E. cloacae* complex 株について、MLST による分子疫学的解析とプラスミド解析を行ったところ、この地域で主流となっている ST78 の株が地域内の複数の病院に広がっていることが判明した。愛知県のネットワークで検出されたユニークな薬剤耐性プロファイルを示した *E. cloacae* complex 4 株と大阪で検出された 1 株を解析したところ、前 4 株は IMI-9 産生後者は IMI-1 産生 *E. bugandensis* と同定された。高齢者施設入居者や在宅医療を受けている高齢者では、約 25% に ESBL 産生菌の継続的な保菌が見られた。継続的に保菌されているのは、約半数は同じ遺伝型で、約半数は異なる遺伝型の株であった。継続保菌率は時間が経つと共に低下していくと考えられた。

いずれも、耐性菌の詳細な薬剤耐性機序や分子疫学的解析を加えることにより、地域での薬剤耐性菌対策に活かせる情報が得られることが分かった。

A. 研究目的

薬剤耐性菌対策は国の AMR 対策アクションプランに基づき継続的に取り組むべき課題であるが、この課題解決には、単施設の対策だけでは不十分で、地域連携で情報共有し足並みをそろえた対策が必要となる。その際に、薬剤耐性菌の耐性機序や、分子疫学的解析を行い情報共有することが重要である。本研究では、愛知県の地域連携サーベイランスをベースに収集したカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）株などの薬剤耐性菌について詳細な薬剤耐性機序や分子疫学的解析を加えることにより、地域での薬剤耐性菌対策に活かせる情報が得られるかを検証する。

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 *E. cloacae* complex 株の検討

2015 年から 2019 年の間に地域連携で収集されたカルバペネマーゼ産生 *E. cloacae*

complex12 株について MinION, そして MiSeq を用いて NGS 解析を行い、それぞれの菌株が持つ、薬剤耐性因子とプラスミドを解析すると共に、Multi Locus Sequence Typing (MLST) による分子疫学的解析を行った。

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。これらの株に加え、大阪の病院で検出された同様の薬剤耐性プロファイルを示す *E. cloacae* complex 株を加え、その耐性機序、MLST, 亜種同定を行った。

3) 名古屋市内の高齢者施設に入所中または在宅医療を受けている高齢患者の継続的薬剤

耐性菌保菌についての研究

名古屋市内の高齢者施設入所中または在宅医療を受けている高齢患者 80 名について、3-9 か月の期間を開けて便検体を採取し、第 3 世代セファロスポリン耐性菌の保菌状況を調査した。2 回の保菌調査で保菌陽性であった菌株について POT 法による分子疫学的解析を行った。また継続的に保菌状態であるリスク因子について解析を行った。

(倫理面への配慮)

1) 2) の研究は地域連携サーベイランスで収集された菌株を用いた研究であり、患者の臨床情報や検体を取り扱わない研究であるが、名古屋大学医学部附属病院生命倫理委員会の倫理審査で承認を受けたのちに研究を行った。(承認番号：2017-0396)

3) の研究は患者の臨床情報や検体を取り扱う研究であり、名古屋大学医学部附属病院生命倫理委員会の倫理審査で承認を受けたのちに研究を行った。(承認番号 2015-0196)

C. 研究結果

1) MLST の結果では、カルバペネマーゼ産生 *E. cloacae* complex 株は ST78 がこの地域で拡散していることが判明した。最も検出が多かったのは病院 A であったが、2015 年には病院 D で、2018 年では病院 J で、2019 年には病院 H で検出されていた(表 1)。プラスミドと耐性因子のプロファイルを見ると、ST78 では、病院 A と H で検出されている株のプラスミドや耐性プロファイルが類似していたが、病院 D で検出された株はプラスミドがなく、耐性因子は染色体に integrate されている可能性が考えられた。病院 J の株は ST は同じであるが耐性因子やプラスミドのプロファイルが異なっていた。ST25 と ST29 の株は遺伝的には非常に近縁であった(表 2)。

2) 愛知県の地域連携で検出されたユニークな薬剤耐性プロファイルを示した *E. cloacae* complex 4 株は IMI-9 産生 *E. bugandensis* と同定された。大阪で分離された *E. cloacae* complex 株を解析すると、我々の地域で検出された株とは ST が異なり、IMI-1 を産生していた(表 3)。菌種の同定ではやはり *E. bugandensis* であった(図 1)。

3) 高齢者施設入居者または在宅医療サービスを受けている高齢者 80 名について、3-9 か月の間隔をあけて便検体を採取して、第 3 世代セファロスポリン耐性菌をスクリーニングしたところ、20 名が継続的に保菌状態であった。菌種同定と薬剤耐性機序の解析によると、その多くは CTX-M-9 型 ESBL 産生大腸菌であり、カルバペネム耐性菌は検出されなかった。POT 法により分子疫学的解析を行うと、20 例中 11 例(55%)は同じ遺伝型の株であった。同じ高齢者施設内の異なる患者でも同じ遺伝型の株が見られており、施設内での水平伝播が示唆された(表 4)。い回目の保菌調査が陽性となった患者で 2 回目に再び耐性菌保菌されているかどうかを解析してみると、2 回目の保菌調査までの間隔が長くなるほど、2 回目の保菌陽性率が減少することが認められた(図 2)。

D. 考察

1) 地域連携サーベイランスで収集したカルバペネマーゼ産生 *E. cloacae* complex 株について、MLST による分子疫学的解析とプラスミド解析を行ったところ、この地域で主流となっている ST78 の株が地域内の複数の病院に拡がっていることが判明した。詳細な解析によれば、同じ ST の株でもプラスミドのプロファイルが異なるものもあり、単に患者移動による施設間伝播という事ではなく、何らかの形で人に親和性のあ

るクローンである ST78 が拡がっていることが示唆された。

- 2) IMI 型カルバペネマーゼは *E. cloacae* complex に見いだされた染色体性カルバペネマーゼの一つであったが、最近プラスミド性のもも見出されてきており、*E. coli* や *K. varicola* などから検出された報告がある。今回大阪株を加えて解析したところでは、おそらくプラスミド性の IMI 型カルバペネマーゼは *E. bugandensis* 保有されているものと推定された。
- 3) 高齢者施設や在宅医療を受けている高齢者では、約 25% に ESBL 産生菌の継続的な保菌が見られた。これらの継続的保菌者は遺伝的に同じ株を保菌しているわけではなく、約半数は異なる遺伝型の株であった。継続保菌率は時間が経つと共に低下していくと考えられた。

E. 結論

1), 2), 3) いずれにおいてもサーベイランスで検出された耐性菌について、詳細な耐性機序の解明と分子疫学的解析を加えることにより、地域での感染対策を行う上で有益な情報が得られることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii S, Muraki Y, Kusama Y, Yagi T, Goto R, Ebisui A, Kawabe A, Inose R, Ohmagari N. ; The Trend for Antibiotic Use for Clostridioides (Clostridium) difficile Infection in Japan. Biol Pharm Bull. 43(4); 693-696, 2020.
- 2) Muraki Y, Kusama Y, Tanabe M, Hayakawa K, Gu Y, Ishikane M, Yamasaki D, Yagi T, Ohmagari N. ; Impact of antimicrobial stewardship

fee on prescribing for Japanese pediatric patients with upper respiratory infections. BMC Health Serv Res. 20(1); 399, 2020.

- 3) Goto R, Inose R, Kusama Y, Kawabe A, Ishii S, Ebisui A, Ishikane M, Yagi T, Ohmagari N, Muraki Y. ; Trends of the Use of Anti-methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Agents in Japan Based on Sales Data from 2006 to 2015. Biol Pharm Bull. 43(12); 1906-1910, 2020.
- 4) 八木哲也. カルバペネム耐性腸内細菌 (CRE)/カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) に対する感染対策 (解説). 日本臨床微生物学会雑誌. 30(4); 245-252, 2020.

2. 学会発表

- 1) 井口光孝, 北川 佳奈子, 稲垣 孝行, 加藤 善章, 八木 哲也, 六鹿 雅登, 碓氷章彦. Daptomycin の短期投与で急速に MIC 値の上昇を認めた市中獲得型 MRSA による感染性心内膜炎の一例. 第 68 回日本化学療法学会総会. 2020 年 9 月. 兵庫県神戸市.
- 2) 八木哲也. 感染制御専門家の立場から. 第 30 回日本医療薬学会年会. 2020 年 10 月 - 11 月. WEB.

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

表 1

Hospital	n	Year				
		2015 Jan-March	2016 Jan-March	2017 Jan-March	2018 Jan-March	2019 Jan-March
Hospital A	14	ST78 (1)	ST78 (4)	ST78 (6) ST25 (1)	ST133(1) ST78(1)	none
Hospital B	5	ST113(1) ST513(2)	none	ST53(1)	ST113(1)	none
Hospital C	1	none	ST29(1)	none	none	none
Hospital D	1	ST78(1)	none	none	none	none
Hospital H	1	none	none	none	none	ST78 (1)
Hospital J	1	none	none	none	ST78 (1)	none
Total	23	ST78 (2) ST113(1) ST513(2)	ST78 (4) ST29(1)	ST78 (6) ST25(1) ST53(1)	ST78 (2) ST113(1) ST133(1)	ST78(1)

表 2

Facility	Genotype	Plasmid	MLST	Year
A	aac(6')-IIc, blaACT-6, blaIMP-1, qnrB6, sul1	IncFIB(pECLA), IncFII(pECLA), IncHI2, IncHI2A	25	2017
C	aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib- Hangzhou, blaACT-6, blaIMP-1, fosA	IncFIB(pECLA), IncFII(pECLA)	29	2016
A	aac(6')-IIc, blaACT-7, blaIMP-1, fosA, qnrB6, sul1, tet(B)	Col440I, IncHI2, IncHI2A	133	2018
B	aac(6')-IIc, aadA1, blaACT-15, blaIMP-1, fosA, qnrB6, sul1, tet(B)	IncFIB(pECLA), IncFII(pECLA), IncHI2, IncHI2A	113	2018
D	aac(6')-IIc, blaACT-5, blaIMP-1, fosA, qnrB6, sul1, tet(B)	None	78	2015
J	aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib- Hangzhou, blaACT-5, blaIMP-1, dfrA15, fosA, fosE, qnrS1, sul1	IncFIB(pHCM2), IncW	78	2018
A	aac(6')-IIc, blaACT-5, blaIMP-1, dfrA15, fosA, qnrB6, sul1, tet(B)	Col440I, IncFIB(pHCM2), IncHI2, IncHI2A	78	2015
A	aac(6')-IIc, blaACT-5, blaIMP-1, fosA, qnrB6, sul1, tet(B)	IncHI2, IncHI2A	78	2017
H	aac(6')-IIc, blaACT-5, blaIMP-1, dfrA15, fosA, qnrB6, sul1, tet(B)	IncFIB(pHCM2), IncHI2, IncHI2A	78	2019
A	aac(6')-IIc, blaACT-5, blaIMP-1, dfrA15, fosA, qnrB6, sul1, tet(B)	IncFIB(pHCM2), IncHI2, IncHI2A	78	2018
A	aac(6')-IIc, blaACT-5, blaIMP-1, dfrA15, fosA, qnrB6, sul1, tet(B)	IncFIB(pHCM2), IncHI2, IncHI2A	78	2016
A	aac(6')-IIc, blaACT-5, blaIMP-1, dfrA15, fosA, qnrB6, sul1, tet(B)	IncFIB(pHCM2), IncHI2, IncHI2A	78	2016

表 3

	MLST							
	Sequence Type	dnaA	fusA	gyrB	leuS	pyrG	rplB	rpoB
地域株	-	~246	18	124	32	30	~8	29
大阪株	-	112	18	161	173	264	8	30

	耐性遺伝子				
	blaACT-49	blaIMI	fosA	oqxA10	oqxB20
地域株	●	● (IMI-9)	●	●	●
大阪株	●	● (IMI-1)	●	●	●

図 1

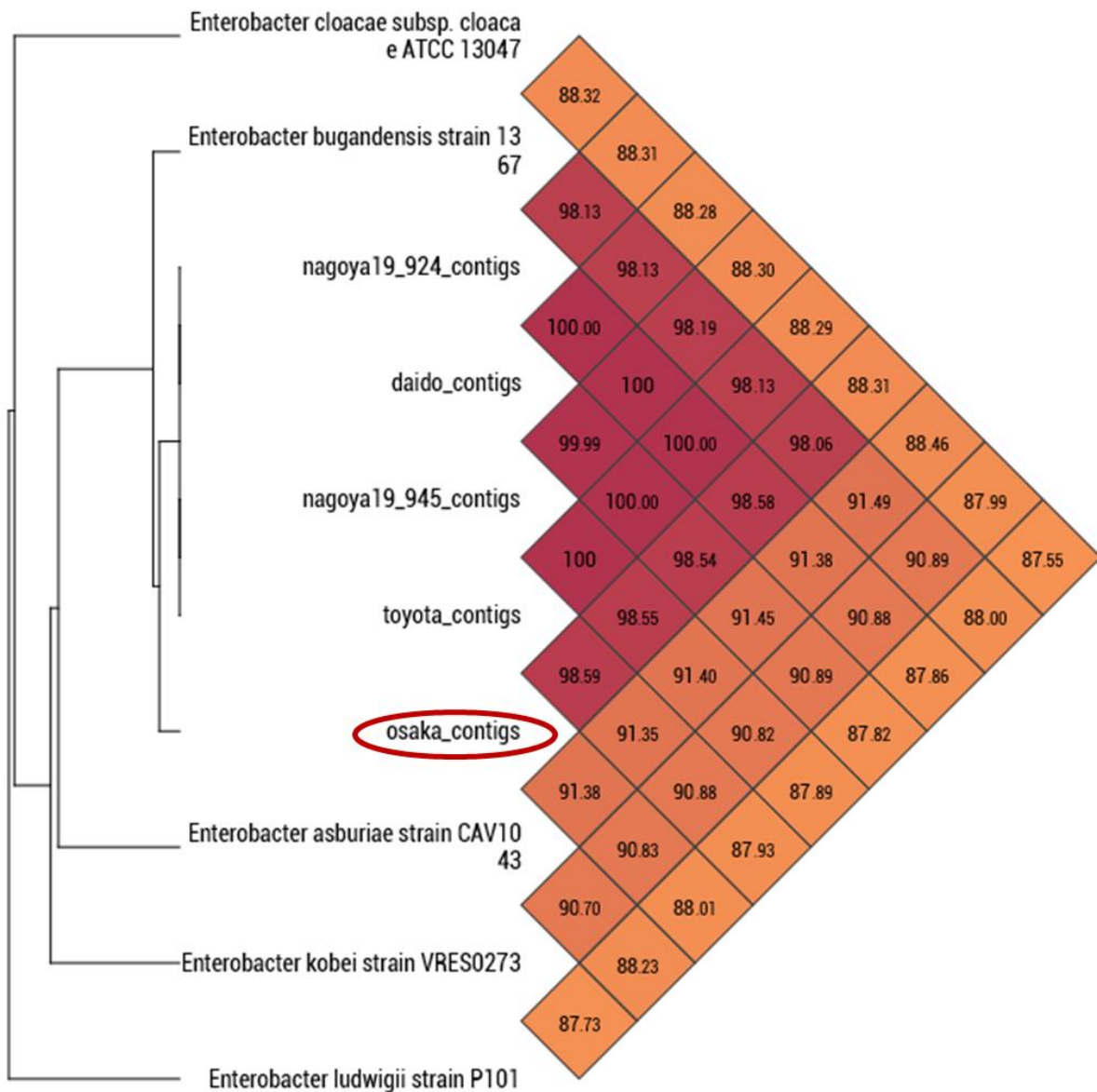


表 4

Case ID	Residency	Age	Gender	First survey	POT type	Second survey	POT type	Interval
A	Home	88	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-1, TEM]	49-17-26	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-1, TEM]	49-17-26	231
B	Home	88	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-50-83	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-56-17	231
C	Facility 1 ⁵¹	83	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-50-23	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-50-23	286
D	Facility 1 ⁵¹	90	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-60-105*	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-60-105*	181
E	Facility 1 ⁵¹	81	M	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-57-86	<i>Escherichia coli</i> [TEM]	49-60-105*	283
F	Facility 2 ⁵²	78	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-26-19	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-26-19	257
				<i>Enterobacter cloacae</i> spp. [AmpC-phenotype]				
G	Facility 3 ⁵³	91	F	<i>Escherichia coli</i> [AmpC]	8-96-16	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-58-83	123
H	LTHCF ⁵⁴	93	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-62-115	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-62-115	104
I	LTHCF ⁵⁴	83	M	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-30-115	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-30-115	107
J	LTHCF ⁵⁴	87	M	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	61-242-143	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	61-242-143	114
K	LTHCF ⁵⁴	90	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-1, TEM]	49-31-190	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-1, TEM]	49-31-190	111
L	LTHCF ⁵⁴	87	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-54-239	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-54-239	104
M	LTHCF ⁵⁴	93	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-58-19	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-58-19	106
N	LTHCF ⁵⁴	90	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-60-237**	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-60-237**	111
O	LTHCF ⁵⁴	97	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-60-237**	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-28-237	119
P	LTHCF ⁵⁴	87	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-60-229	<i>Escherichia coli</i> [TEM]	49-60-237**	106
Q	LTHCF ⁵⁴	95	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	16-18-143	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-60-237**	105
R	LTHCF ⁵⁴	89	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-254-247	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-1]	16-19-86	105
S	LTHCF ⁵⁴	90	F	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9]	49-56-145	<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-60-109	106
T	LTHCF ⁵⁴	71	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i> [unknown]		<i>Escherichia coli</i> [CTX-M-9, TEM]	49-60-237**	106

図 2

