

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：34535

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10045

研究課題名（和文）多国間を網羅する薬剤耐性細菌の耐性遺伝子集積配列を用いた分子疫学手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of molecular epidemiological method using resistance gene accumulation sequence of drug-resistant bacteria in multiple countries

研究代表者

大澤 佳代（OSAWA, Kayo）

神戸常盤大学・保健科学部・教授

研究者番号：50324942

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：神戸大学やインドネシアの関連病院から分離された薬剤耐性細菌について、2国間での薬剤耐性菌の分子疫学手法により解析を行い、インドネシア株と日本株の類似性が高いことを確認したほか、薬剤耐性遺伝子の局在性として染色体性とプラスミド性の菌株での系統的な違いが認められた。カルバペネム耐性細菌からのNDM-1型カルバペネマーゼ遺伝子をもつプラスミドについて2つの系統が確認された。一人の患者から分離された緑膿菌株について、薬剤耐性に至る経過を追ったところ、分離株の全ゲノム配列決定により、薬剤耐性に影響を与える重要な一塩基多型を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性細菌の染色体やプラスミド上に存在する薬剤耐性遺伝子を含む耐性遺伝子集積配列を基にした細菌株の相同性解析は、単なる細菌染色体間の比較だけではなく、薬剤耐性細菌株の耐性遺伝子の由来に基づく比較も加わるため、今後の分子疫学調査に役立つこととなる。日本国内だけでなく、インドネシアなどの多国間における抗菌薬使用状況などの患者背景因子と薬剤耐性細菌の分子疫学的比較を行うことで、新たな国際的感染制御対策の確立に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed drug-resistant bacteria isolated from related hospitals in Kobe University and Indonesia by the Multiple-Locus Variable Number Tandem-Repeat Analysis as a molecular epidemic method, and detected highly similarities between Indonesian and Japanese strains. We also analyzed the localization and accumulation site of the drug resistance genes in drug-resistant bacteria, and found that there was a phylogenetic difference in lineage between the genes in chromosome and in plasmid. In addition, we confirmed two lineage of plasmids carrying the NDM-1 type carbapenemase gene among carbapenem-resistant bacteria. Furthermore, we found an important single nucleotide polymorphism that affected drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from one patient by whole genome sequencing analysis.

研究分野：感染制御学

キーワード：薬剤耐性 分子疫学 基質特異性拡張型 ラクタマーゼ カルバペネマーゼ MLVA MLST プラスミド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 1) 薬剤耐性細菌と疫学診断の重要性

現在、医療現場において、抗菌薬が効かなくなる薬剤耐性細菌が環境から医療関連施設に至るあらゆるところから検出されてきている。このような薬剤耐性細菌の世界的な増加に伴い、2015年5月の世界保健総会では薬剤耐性 (Antimicrobial Resistance: AMR) に関する加盟国での国家行動計画の策定が求められ、早急な対応が求められている。薬剤耐性細菌を監視するためにはその拡散過程を知るために、遺伝子解析を用いた分子疫学調査に基づく感染対策が重要である。

#### 2) 薬剤耐性細菌の迅速・疫学診断の必要性

これまで我々は、国内外由来の薬剤耐性細菌のうち、抗菌薬分解酵素である  $\beta$ -ラクタマーゼを産生する腸内細菌科細菌及び緑膿菌における疫学的ならびに分子生物学的特徴を明らかにしてきた。腸内細菌科細菌や緑膿菌は  $\beta$ -ラクタム系薬、アミノグリコシド系薬、キノロン系薬などにそれぞれに耐性を示すのみならず、これらのうちの何種類かの薬剤耐性遺伝子を同時に保有するような多剤耐性を示す場合もある。このような多剤耐性化機構の一つとして、薬剤耐性遺伝子はそれを規定する耐性遺伝子が集積した形で存在することが知られている。耐性遺伝子集積配列はインテグロン、トランスポゾンとも呼ばれ、上図に示す挿入配列により細菌の染色体や染色体以外に遺伝情報を持つプラスミドを介して容易に他の細菌へ移動することができる。しかしながら、耐性遺伝子集積配列が1菌株あたり1か所に存在するとはかぎらず、特にその解析はシーケンシングに基づいて確認する必要がある。耐性遺伝子の検出だけでは、単に遺伝子の保有という情報のみであるが、耐性遺伝子集積配列の保有状況を知ることで、その細菌株特有の耐性遺伝子が起源となった株を特定できることから耐性伝播の傾向を知ることができ、感染対策にかかわる薬剤耐性細菌株の固有の情報として疫学調査に役立つ。このため、薬剤耐性細菌の耐性遺伝子保有状況だけでなく耐性遺伝子集積情報により耐性伝播の起源や傾向を知るための遺伝子情報に基づいた分子疫学的手法が望まれている。

### 2. 研究の目的

薬剤耐性細菌の染色体やプラスミド上に存在する薬剤耐性遺伝子を含む耐性遺伝子集積配列を基にした細菌株の相同性解析と、患者の背景因子に基づく、それらの比較を踏まえた多国間での感染制御対策への寄与する分子疫学手法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3-1) 材料

神戸大学医学部附属病院及び関連施設やインドネシア (アイルランガ大学) などの関連施設から分離された腸内細菌科細菌、非発酵菌を収集した。一部の細菌については、薬剤耐性との関連を調べるため薬剤耐性細菌検出患者における背景因子、治療歴などの情報収集を行った。

#### 3-2) 方法

・各国にて検出された細菌に対して  $\beta$ -ラクタム系薬、アミノグリコシド系薬、キノロン系薬の薬剤感受性試験を実施し、各種薬剤耐性細菌を検出した。

・PCR法にて各種薬剤耐性遺伝子 ( $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子: *bla*CTX-M, *bla*IMP, *bla*VIM, *bla*KPC, *bla*NDM, 他; アミノグリコシド耐性遺伝子: *erm*, *aac*(6')-*ib*, 他; キノロン耐性遺伝子: *qnr* など) の検出やシーケンス解析による型別を行った。さらに一部の菌については次世代シーケンスによる全ゲノム解析を行った。

・疫学手法として Multilocus locus Sequence Typing (MLST) や rep-PCR、Multiple-Locus Variable Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) などを用いて菌株同士の類似性や相同性の確認を行った。

### 4. 研究成果

#### 4-1) インドネシアおよび日本におけるカルバペネム耐性グラム陰性桿菌の調査

インドネシアでのカルバペネム耐性グラム陰性桿菌を22株分離し、これらは、*Acinetobacter baumannii* (n=4)、*Pseudomonas aeruginosa* (n=4)、*Klebsiella pneumoniae* (n=5)、*Providencia rettgeri* (n=4) などであり、そのカルバペネマーゼはNDM-1 (n=18, 81.8%) およびIMP-7 (n=4, 18.2%) であった。分離された患者のうち、12人 (54.5%) が重症例で3人が死亡した (死亡率13.6%)。この結果は *Int J Urol.* (2018) に掲載された。

兵庫県において分離されたカルバペネム耐性緑膿菌21株のうち、13株 (61.9%) がカルバペネマーゼの一種であるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ陽性であり、IMP-1が11株 (52.4%)、IMP-7が1株 (4.5%) およびVIM-1が1株 (4.5%) であった。これらの株の相同性をrep-PCRによる疫学解析により確認したところ、IMP-1とIMP-7やVIM-1などの系統が異なっていた。緑膿菌においてはカルバペネマーゼの存在が染色体性であるとの報告もあり、そのことが系統的な違いとなったものを推察され、この結果は *Int J Urol.* (2019) に掲載された。

#### 4-2) インドネシアにおける環境中およびヒト由来の *Vibrio cholerae* の薬剤耐性の調査

2009年から2017年にインドネシアにおける小児下痢症患者からの便及び養殖場から採取された海老より分離した *V. cholerae* 44株について、薬剤感受性、血清型O1またはO139遺伝子とコレラ毒素を含む毒素産生性などの病原性、遺伝子型及び菌株同士の相同性の確認などの疫学調査を行った。環境サンプルからのそれらの分離株は、アンピシリン、ストレプトマイシンおよびナリジクス酸に対する耐性を示し、MLST法により型別としてSequence Type (ST) 69が38.6%を占めていた。これらの株はクローンのように広がっており、この結果は *Indian J*

Microbiol. (2020)に掲載された。

#### 4-3) インドネシアから分離されたプラスミドタイピングと薬剤耐性・病原性との関係

インドネシアで分離された薬剤耐性菌株についての解析として、2015-2016年に分離されたインドネシア株における基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生株である *Klebsiella* 94 株についてその病原性および薬剤耐性に関わるプラスミドタイピングとの関連を J Infect Chemother. (2021)に、またキノロン耐性などの耐性を示す 50 株における交差耐性を示した内容については Curr Microbiol. (2021)に掲載された。

#### 4-4) 大腸菌における新規疫学手法の検討

ESBL 産生大腸菌について、世界での流行に関わっている遺伝子型である ST131 クローンが重要である。ST は、詳細なクローン分類を可能にするが、7種の遺伝子の塩基配列を決定する必要がありコストと時間を要する。そこで、MLST に用いられる *fumC* アレル番号と鞭毛遺伝子である *fimH* 型の組み合わせによる CH タイピングにより、2016年から2017年に兵庫県内で分離された ESBL 産生大腸菌 83 株について、CH タイピングを行った結果、15 タイプが検出された。最も多く検出された型は CH40-30 で、83 株中 54 株 (65%) を占めていた。ST131 特異的 PCR の結果、*fumC* のアレル番号が 40 となるクローンは全て ST131 であった。今回の報告は、本邦での ESBL 産生株は、ST131 に関わる CH40-30 が中心となっていることが確認でき、Int J Mol Sci. (2019)に掲載された。

#### 4-5) MLVA 法により次世代シーケンスによる薬剤耐性遺伝子群の解析

インドネシア株と日本株の2国間での薬剤耐性菌の分子疫学的解析を行った。対象はインドネシアの ESBL 産生大腸菌 115 株 (CTX-M-15 型 99 株含む) と日本の ESBL 産生大腸菌 72 株 (CTX-M-14 型 33 株を含む) ならびにカルバペネム産生大腸菌 23 株 (すべて IMP-6 型 23 株、CTX-M-2 型 20 株含む) を用いた。その結果、インドネシア株と日本株に同等の類似性をもつ株が多く認められた。MLVA の解析結果は、カルバペネム耐性遺伝子や ESBL 遺伝子タイプ別の観点から菌株間の遺伝的多様性を調べ、さらにスクリーニングに見合う領域を見出す優れた方法であることが確認された。

#### 4-6) 緑膿菌における感性から耐性に至る機構の解明

緑膿菌感染症の一人の患者から分離された株について、臨床的背景因子および治療情報とともに、2ヶ月間にわたって得られた6つの分離株の次世代シーケンスによる全ゲノム配列決定により、排出ポンプ発現および抗菌剤耐性に影響を与える2つの重要な一塩基多型 (SNP) が薬剤排出ポンプに関わる *mexR* およびキノロン耐性遺伝子 *gyrB* において明らかにされ、J Infect Chemother. (2019) に掲載された。

#### 4-7) 染色体性もしくはプラスミド性に存在する耐性遺伝子の集積部位の解析

インドネシアで分離された ESBL 産生大腸菌について、CTX-M-15 型が染色体上あるいはプラスミド上に存在しているかどうかという遺伝子局在をサザンブロットハイブリダイゼーションによって確認した。CTX-M-15 遺伝子を保有する 54 株のうち、27 株が染色体上に、20 株がプラスミド上に、7 株が染色体とプラスミド上に局在を示した。染色体上の CTX-M-15 遺伝子を持つ 27 株の MLST は ST405 (25.9%) および ST131 (22.2%) 株だったが、プラスミド上に CTX-M-15 遺伝子を持つ 20 株はほとんど ST410 (55.0%) であり、染色体性とプラスミド性において菌株の系統の違いが認められた。プラスミド上に CTX-M-15 遺伝子を持つ ESBL 産生大腸菌は、ピペラシリン-タゾバクタムに対して有意に高い耐性率を示した。この結果は、Int J Urol. (2021) に掲載された。

#### 4-8) 耐性遺伝子集積配列群の保有状況の確認

インドネシア株のうち、カルバペネム耐性細菌の DNA を S1 nuclease 処理後パルスフィールド電気泳動を実施し、プラスミド DNA バンドをそれぞれ切り出し、DNA を抽出後、次世代シーケンサーにより配列解読を実施した。解析した 8 株から S1-PFGE によりそれぞれ 1~3 つずつのプラスミドバンドが確認でき、特に *Klebsiella* 株で確認された NDM-1 型カルバペネム耐性遺伝子をもつプラスミド遺伝子 (カッコ内はプラスミドの名称) には *IncFIB(pOil)*、*IncFII(K)* と *IncFIB(S)*、*IncFIB(pB171)*、*IncFII(Yp)* という 2 つの系統が確認された。今後その違いについて詳細に確認を行う予定である。

#### 4-9) 薬剤耐性細菌に対する新規合成薬剤の効果

新規合成薬剤について、様々な薬剤耐性細菌への効果を検討中である (第 93 回日本細菌学会総会学会発表, 2020 年)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Teramae M, Osawa K, Shigemura K, Kitagawa K, Shirakawa T, Fujisawa M, Miyara T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Prevalence of Quinolone Resistance of Extended-Spectrum $\beta$ -Lactamase-Producing <i>Escherichia coli</i> with ST131-fimH30 in a City Hospital in Hyogo, Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 51-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20205162.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Osawa K, Shigemura K, Kitagawa K, Kuntaman K, Mertaniasih NM, Setyarini W, Arizandy D, Rahadjo D, Osawa R, Shirakawa T, Fujisawa M.	4. 巻 60
2. 論文標題 Difference of Phenotype and Genotype Between Human and Environmental: Isolated <i>Vibrio cholerae</i> in Surabaya, Indonesia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Indian J Microbiol.	6. 最初と最後の頁 230-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12088-020-00861-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Osawa K, Shigemura K, Kitagawa K, Fukuda T, Takasaka A, Wakabayashi S, Sato K, Yamamichi F, Shirakawa T, Fujisawa M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Molecular characteristics of carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolated from urine in Hyogo, Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Urol.	6. 最初と最後の頁 127-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13818.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuntaman K, Shigemura K, Osawa K, Kitagawa K, Sato K, Yamada N, Nishimoto K, Yamamichi F, Rahardjo D, Hadi U, Mertaniasih NM, Kinoshita S, Fujisawa M, Shirakawa T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Occurrence and characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: A collaborative study of antibiotic-resistant bacteria between Indonesia and Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Urol.	6. 最初と最後の頁 966-972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.13787.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakanishi N, Nomoto R, Sato K, Koike C, Kusuki M, Nakamura T, Shigemura K, Shirakawa T, Fujisawa M, Tokimatsu I, Osawa K.	4. 巻 25
2. 論文標題 Acquisition of antimicrobial-resistant variants in repeated infections caused by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> revealed by whole genome sequencing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 154-156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.07.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saya Yamasaki, Katsumi Shigemura, Kayo Osawa, Koichi Kitagawa, Aya Ishii, K Kuntaman, Toshiro Shirakawa, Takayuki Miyara, Masato Fujisawa.	4. 巻 27
2. 論文標題 Genetic analysis of ESBL-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from UTI patients in Indonesia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Infect Chemother.	6. 最初と最後の頁 55-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.08.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Aya Ishii, Katsumi Shigemura, Koichi Kitagawa, Mizuki Harada, Yuki Kan, Fuka Hayashi, Kayo Osawa, K Kuntaman, Toshiro Shirakawa, Masato Fujisawa.	4. 巻 78
2. 論文標題 Cross-Resistance and the Mechanisms of Cephalosporin-Resistant Bacteria in Urinary Tract Infections Isolated in Indonesia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1771-1777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00284-021-02415-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Young-Min Yang, Kayo Osawa, Koichi Kitagawa, Samiko Hosoya, Reo Onishi, Aya Ishii, Toshiro Shirakawa, Itaru Hirai, Kuntaman Kuntaman, Hiroshi Tanimoto, Katsumi Shigemura, Masato Fujisawa.	4. 巻 28
2. 論文標題 Differential effects of chromosome and plasmid blaCTX-M-15 genes on antibiotic susceptibilities in extended-spectrum beta-lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> isolates from patients with urinary tract infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Urol.	6. 最初と最後の頁 623-628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14498.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 重村克巳、大澤佳代、角井健太、北川孝一、大沼健一郎、宇田篤史、中野雄造、宮良高維、藤澤正人
2. 発表標題 カルバペネム耐性尿路感染症原因菌の国際比較の検討
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎さや、重村克巳、大澤佳代、北川孝一、石井彩、藤澤正人
2. 発表標題 インドネシアにおける尿路感染症由来Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) 産生Klebsiella pneumoniaeの遺伝子解析
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山村 初雄, 加藤 久登, 勝 孝, 増田 和文, 大澤 佳代, 宮川 淳
2. 発表標題 ペプチドをもとにした新規合成抗菌物質と薬剤耐性菌への効果
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤加奈子、大澤 佳代、重村 克巳、楠木 まり、中村 竜也、時松 一成、藤澤 正人
2. 発表標題 カルバペネム耐性緑膿菌の薬剤耐性機構の解析
3. 学会等名 第66回日本化学療法学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷 砂美子、大澤 佳代、久保 綾乃、木下 承皓、佐藤 小春、Dadik Raharjo、Kuntaman Kuntaman、藤澤 正人、平井 到、白川 利朗
2. 発表標題 インドネシアで分離されたCTX-M-15型ESBL産生Escherichia coliにおける染色体性およびプラスミド性についての分子疫学調査
3. 学会等名 第13回日本臨床検査教育学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細谷 砂美子、大澤 佳代、重村 克巳、北川 孝一、西本 健人、Kuntaman Kuntaman、Dadik Rahardjo、木下 承皓、藤澤 正人、白川 利朗
2. 発表標題 インドネシアの尿路感染症患者より分離されたカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌の分子疫学的 調査
3. 学会等名 第13回日本臨床検査教育学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重村克巳、大澤佳代、江夏徳寿、北川孝一、白川利朗、中野雄造、藤澤正人
2. 発表標題 尿路感染症におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の分子生物学的検討ならびに迅速診断法の確立
3. 学会等名 第28回泌尿器分子細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細谷砂美子、重村克巳、宮良高維、北川孝一、中西典子、木下承皓、大澤佳代、Kuntaman Kuntaman、白川利朗、藤澤正人
2. 発表標題 インドネシア尿路感染症患者より検出されたCTX-M-15型ESBL産生E.coliの染色体性もしくはプラスミド性における薬剤感受性の比較
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	重村 克巳  (SHIGEMURA Katsumi)  (00457102)	神戸大学・保健学研究科・准教授   (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
インドネシア	アイルランガ大学	ストモ病院	