

## 会場までのアクセス

車で: 東京方面／関越自動車道「練馬 I.C」 → 北陸自動車道「黒部 I.C」[約 4 時間 30 分]

大阪方面 / 「豊中 I.C」 → 北陸自動車道「黒部 I.C」[約 4 時間 30 分]

名古屋方面 / 「一宮 I.C」 → 北陸自動車道「黒部 I.C」[約 3 時間 30 分]

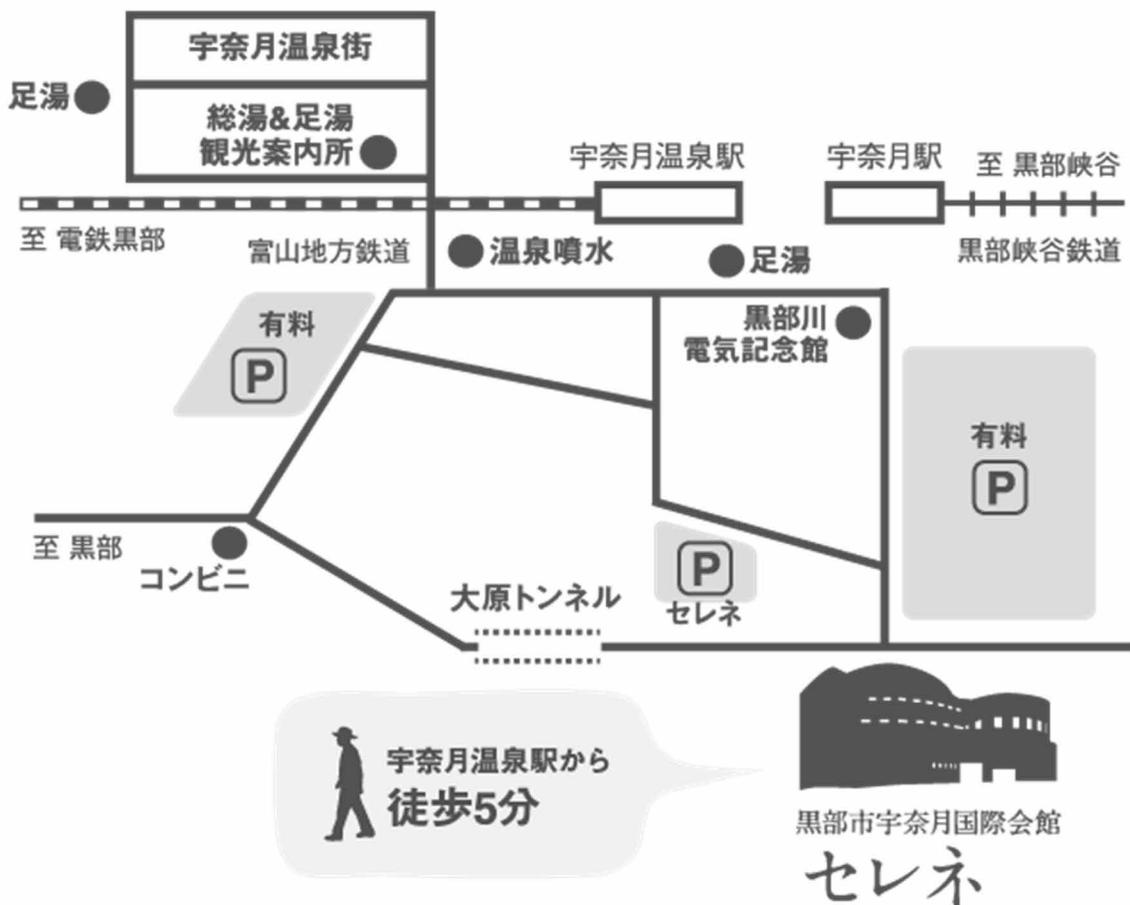
電車で: 東京方面／北陸新幹線「黒部宇奈月温泉」→ 富山地方鉄道「新黒部駅」→ 「宇奈月温泉駅」  
[約 2 時間 45 分]

大阪方面／サンダーバード 金沢行 → 北陸新幹線「黒部宇奈月温泉」→ 富山地方鉄道  
[約 3 時間 40 分]

名古屋方面／高山本線 富山方面行 → 富山地方鉄道 [約 3 時間 30 分]

飛行機で: 東京から／羽田空港 → 富山きときと空港 → バス「富山駅」→ 富山地方鉄道  
[約 2 時間 25 分]

札幌から／新千歳空港 → 富山きときと空港 → バス「富山駅」 → 富山地方鉄道  
[約 3 時間]



・研究会会場のセレネから宿の延對寺莊まではおよそ 800m です。

・初日終了時、および 2 日目開始時は、セレネと宿の間をバスが運行します。ご利用ください。

# ご 案 内

## 1. 参加受付

受付は11月15日（金）12:00より3F会議室A付近にて行います。

## 2. 宿泊／参加費

18,000円（内訳：年会費1,000円、研究会参加費6,000円、宿泊費11,000円）  
（個室希望の方は別途10,000円）

## 3. 口演発表

- ・一般演題の口演時間は12分程度とし、質疑応答を含めて15分です。
- ・1演題あたりスライド12枚程度でお願いします。
- ・発表はマイクロソフトパワーポイントでお願いします。
- ・液晶プロジェクターの入力端子はDsub-15ピンのみです。必要な場合はアダプターをご持参下さい。USBメモリ等で発表データをお持ちの方は、発表用PC（windows10, PowerPoint2013）を使用して頂くこともできます。Macintoshをご利用の方はご自身のPC本体をご持参下さい。
- ・発表に際し、COIやスポンサーシップ等につきましては、先生方ご自身で対応願います。

## 第48回薬剤耐性菌研究会プログラム

2019年11月15日(金)

12:55~17:15

12:55~13:00

開会の挨拶

菅井 基行(国立感染症研究所)

一般演題：発表12分、討論3分

13:00~14:00

座長：橋本 佑輔(群馬大学)

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌

**遺伝子系統解析による富山県で分離されたカルバペネマーゼ遺伝子を有しない  
カルバペネム耐性 *Klebsiella aerogenes* の特徴**

○綿引正則<sup>1</sup>，内田薫<sup>1</sup>，松井真理<sup>2</sup>，鈴木里和<sup>2</sup>，中村雅彦<sup>3</sup>，彼谷裕康<sup>3</sup>，  
磯部順子<sup>1</sup>，大石和徳<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>富山県衛生研究所，<sup>2</sup>国立感染症研究所，<sup>3</sup>富山県立中央病院)

**富山県で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(GRE)の特徴**

○内田薫，綿引正則，金谷潤一，加藤智子，木全恵子，磯部順子，大石和徳  
(富山県衛生研究所細菌部)

**カルバペネム耐性腸内細菌科細菌病原体サーベイランス -2018年**

○松井真理<sup>1</sup>，鈴木里和<sup>1</sup>，菅井基行<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター，全国地方衛生研究所)

**感染症発生動向調査病原体サーベイランスにおける海外型カルバペネマーゼ遺伝子  
検出株の報告状況**

○鈴木里和<sup>1</sup>，松井真理<sup>1</sup>，菅井基行<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター，全国地方衛生研究所)

14:00~15:00

座長：関 みつ子(明海大学)

**NDM 検出歴のない医療機関の病棟シンクから検出された NDM-1, OXA-820 カルバ  
ペネマーゼ産生 *Acinetobacter pittii* ST220 の全ゲノム解析**

○林航<sup>1</sup>，田中隼斗<sup>2</sup>，新井恵理子<sup>3</sup>，名取達矢<sup>3</sup>，堀内一樹<sup>3</sup>，松本剛<sup>3</sup>，飯村将樹<sup>2</sup>，  
曾我英司<sup>2</sup>，長野由紀子<sup>4</sup>，長野則之<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>信州大学大学院 総合医理工学研究科, <sup>2</sup>信州大学大学院 医学系研究科,  
<sup>3</sup>信州大学医学部附属病院 臨床検査部, <sup>4</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科)

### 海外渡航歴のない患者から検出されたNDM-5メタロ-βラクタマーゼを産生する広範囲 抗菌薬耐性 *Escherichia coli* ST746 の解析

○田中隼斗<sup>1</sup>, 新井恵理子<sup>2</sup>, 鈴木眞<sup>2</sup>, 林航<sup>3</sup>, 飯村将樹<sup>1</sup>, 曾我英司<sup>1</sup>,  
長野由紀子<sup>4</sup>, 長野則之<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科, <sup>2</sup>信州大学医学部附属病院 臨床検査部,  
<sup>3</sup>信州大学大学院 総合医理工学研究科, <sup>4</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科)

### ミャンマーの医療施設で分離されたカルバペネム耐性 *Enterobacter cloacae* complex

○大城聡<sup>1</sup>, 多田達哉<sup>1</sup>, 内田大貴<sup>1</sup>, 菱沼朋美<sup>1</sup>, San Mya<sup>2</sup>, Htay Htay Tin<sup>2</sup>,  
切替照雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>順天堂大学医学部微生物学講座, <sup>2</sup>National Health Laboratory, Yangon,  
Myamnar)

### 妊婦におけるβラクタム系低感受性B群レンサ球菌の発見

○諸井博明<sup>1,2,3</sup>, 木村幸司<sup>2</sup>, 小谷友美<sup>3</sup>, 津田弘之<sup>3</sup>, 坂野弘嗣<sup>2</sup>, 金万春<sup>2</sup>,  
和知野純一<sup>2</sup>, 山田景子<sup>2</sup>, 三井崇<sup>4</sup>, 山下守<sup>4</sup>, 吉川史隆<sup>3</sup>, 荒川宣親<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>半田市立半田病院, <sup>2</sup>名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学,  
<sup>3</sup>名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科学, <sup>4</sup>医療法人 葵鐘会)

~☕☕ coffee break 15:00~15:15 ~☕☕

15:15~ 16:15

座長：和知野 純一（名古屋大学）

### プラスミドと耐性菌の疫学

#### プラスミド系統ネットワーク解析の原理と特徴

○鈴木匡弘<sup>1</sup>, 土井洋平<sup>1</sup>, 荒川宣親<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>藤田医科大学医学部微生物学講座, <sup>2</sup>名古屋大学大学院医学系研究科分子病原  
細菌学)

### Super 2DCM の開発

○藤本修平<sup>1</sup>, 村上啓雄<sup>2</sup>, 荒川宣親<sup>3</sup>, 柴山恵吾<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>東海大学, <sup>2</sup>岐阜大学, <sup>3</sup>名古屋大学, <sup>4</sup>国立感染症研究所)

## JANIS・細菌検査データを活用した研究の事例と展望

○矢原耕史<sup>1</sup>，筒井敦子<sup>1</sup>，Adam Clark<sup>2</sup>，藤本健一<sup>3</sup>，川上小夜子<sup>1</sup>，千酌浩樹<sup>4</sup>，井口光孝<sup>5</sup>，八木哲也<sup>5</sup>，Meghan A. Baker<sup>6</sup>，Thomas O' Brien<sup>2,7</sup>，John Stelling<sup>2,7</sup>，宮本直樹<sup>8</sup>，堀田吏乃<sup>8</sup>，矢野知美<sup>8</sup>，田代尚崇<sup>8</sup>，森井大一<sup>10</sup>，八板謙一郎<sup>8,9</sup>，渡邊浩<sup>8,9</sup>，柴山恵吾<sup>10</sup>

(<sup>1</sup>感染研・薬剤耐性研究センター，<sup>2</sup>WHO Collaborating Centre for Surveillance of Antimicrobial Resistance, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA.

<sup>3</sup>帝京大・公衆衛生，<sup>4</sup>鳥取大病院・感染制御部，<sup>5</sup>名古屋大・臨床感染統御学，

<sup>6</sup>Harvard Medical School and Harvard Pilgrim Health. Care Institute, Boston, USA.

<sup>7</sup>Harvard Medical School, Boston, USA. <sup>8</sup>久留米大学病院・検査室，

<sup>9</sup>久留米大学病院・感染制御部，<sup>10</sup>感染研・細菌第二部)

## WHO-GLASS と JANIS の集計方式の相違に関する検討

○梶原俊毅<sup>1</sup>，矢原耕史<sup>1</sup>，平林亜希<sup>1</sup>，安齋栄子<sup>1</sup>，若井知世<sup>1</sup>，柴山恵吾<sup>2</sup>，菅井基行<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター，<sup>2</sup>細菌第二部)

～☕☕ coffee break 16:15～16:30～☕☕

16:30～17:15

座長：綿引 正則（富山県衛生研究所）

## 特別講演

## 地方衛生研究所で行ってきた

## 薬剤耐性菌に関する研究 ～行政的取り組み

河原隆二

(大阪健康安全基盤研究所 微生物部・細菌課)

2 日目

2019年11月16日(土)

9:00~12:05

一般演題：発表 12 分、討論 3 分

9:00~10:00

座長：鈴木 匡弘(藤田医科大学)

### 検出方法

#### 二本鎖 DNA 修飾色素およびナノポア DNA シークエンサーを用いた薬剤耐性菌同定技術

○大野歩<sup>1</sup>，梅澤和夫<sup>2</sup>，クリュコフ キリル<sup>1</sup>，中川草<sup>1</sup>，浅井さとみ<sup>3</sup>，宮地勇人<sup>3</sup>，今西規<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学，<sup>2</sup>東海大学 医学部 外科学系 救急救命医学，<sup>3</sup>東海大学医学部基盤診療学系 臨床検査学)

#### A novel LAMP method detecting $\beta$ -lactamase genes

○Mitsuko Seki<sup>1,2</sup>，Chika Takano<sup>2</sup>，Eun Jin Kim<sup>1,3,4</sup>，Yeong Bae Yoon<sup>1,3,4</sup>，Dong Hyun Lee<sup>1,3,4</sup>，Jiwon Lee<sup>1,3,4</sup>，Yeong Jun Baek<sup>1,3,4</sup>，Satoshi Hayakawa<sup>2</sup>，Tomonori Hoshino<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Division of Pediatric Dentistry, Department of Human Development and Fostering, Meikai University School of Dentistry, Sakado, Japan, <sup>2</sup>Division of Microbiology, Department of Pathology and Microbiology, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan, <sup>3</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Hanyang University, Ansan, South Korea, <sup>4</sup>Institute of Pharmacological Research, Hanyang University, Ansan, South Korea)

### コリスチン耐性

#### 流入下水由来 *Escherichia coli* における *mcr-1* 遺伝子の出現と家禽病原性大腸菌 (APEC) 関連病原遺伝子の共保有

○林航<sup>1</sup>，田中隼斗<sup>2</sup>，飯村将樹<sup>2</sup>，曾我英司<sup>2</sup>，久保亮一<sup>3</sup>，川村久美子<sup>4</sup>，長野由紀子<sup>4</sup>，荒川宜親<sup>4</sup>，長野則之<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>信州大学大学院 総合医理工学研究科，<sup>2</sup>信州大学大学院 医学系研究科，<sup>3</sup>関東化学株式会社 試薬技術部，<sup>4</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科)

#### コリスチン耐性の付与が及ぼす大腸菌の病原性変化

○佐藤豊孝<sup>1</sup>，山本聡<sup>1</sup>，小笠原徳子<sup>1</sup>，臼井優<sup>2</sup>，鈴木仁人<sup>3</sup>，林航<sup>4</sup>，長野則之<sup>4</sup>，土井洋平<sup>5,6</sup>，田村豊<sup>7</sup>，高橋聡<sup>8,9</sup>，横田伸一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>札幌医科大学・医学部・微生物学，<sup>2</sup>酪農学園大学・獣医学群・食品衛生学，

<sup>3</sup>国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター, <sup>4</sup>信州大学大学・院総合医理工学研究科・医学系専攻, <sup>5</sup>ピッツバーグ大学医学部・感染症内科, <sup>6</sup>藤田医科大学・微生物学・感染症科, <sup>7</sup>酪農学園大学・動物薬教育研究センター, <sup>8</sup>札幌医科大学附属病院・検査部, <sup>9</sup>札幌医科大学・医学部・感染制御・臨床検査医学)

10:00～11:00

座長: 林 航(信州大学)

### 薬剤耐性と創薬

#### 既知の耐性機構を回避する新規アミノ配糖体系抗菌薬の探索と創製

○鈴木仁人<sup>1</sup>, 横山武司<sup>2</sup>, 五十嵐雅之<sup>3</sup>, 高橋良昭<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター, <sup>2</sup>東北大学大学院生命科学研究科 応用生命分子解析分野, <sup>3</sup>公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 第2生物活性研究部, <sup>4</sup>公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 創薬化学研究部)

#### 薬剤耐性遺伝子は潜在性ファージを介して拡散する

○和知野純一, 金万春, 木村幸司, 荒川宜親

(名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学)

#### *Mycoplasma pneumoniae* のクラリスロマイシン耐性遺伝子の検出状況

○小川美保, 坂田竜二, 市村禎宏, 古畑健司

(株式会社ビー・エム・エル 細菌検査課)

#### 耐性結核患者生体内における結核菌の耐性 population 変動の観察

○吉田志緒美<sup>1</sup>, 岩本朋忠<sup>2</sup>, 有川健太郎<sup>2</sup>, 関塚剛史<sup>3</sup>, 黒田誠<sup>3</sup>, 御手洗聡<sup>4</sup>, 露口一成<sup>1</sup>, 井上義一<sup>1</sup>, 鈴木克洋<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>NHO 近畿中央呼吸器センター, <sup>2</sup>神戸市環境保健研究所, <sup>3</sup>国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター, <sup>4</sup>公益財団法人結核予防会 結核研究所)

～☕☕ coffee break 11:00～11:15～☕☕

11:15～12:00

座長: 多田 達哉(順天堂大学)

#### AmpC 変異によるセフィデロコール低感受性化機構の検討

○河合聡人<sup>1</sup>, Ryan K. Shields<sup>2</sup>, Christi L. McElheny<sup>2</sup>, 土井洋平<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>藤田医科大学医学部微生物学講座, <sup>2</sup>ピッツバーグ大学医学部感染症内科)

**ヒト臨床由来 *Enterococcus faecalis* ST634 に認められたリネゾリド耐性遺伝子 *optrA* 保有新奇プラスミド**

○飯村将樹<sup>1</sup>，林航<sup>2</sup>，新井恵理子<sup>3</sup>，名取達矢<sup>3</sup>，堀内一樹<sup>3</sup>，松本剛<sup>3</sup>，田中隼斗<sup>1</sup>，曾我英司<sup>1</sup>，長野由紀子<sup>4</sup>，荒川宜親<sup>4</sup>，長野則之<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科，<sup>2</sup>信州大学大学院 総合医理工学研究科，  
<sup>3</sup>信州大学医学部附属病院 臨床検査部，<sup>4</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科)

**国内医療機関より分離された VanA 型と VanM 型の 2 つのバンコマイシン耐性遺伝子を保有する腸球菌の新規線状プラスミドに関する分子生物学的研究**

○橋本佑輔<sup>1</sup>，野村隆浩<sup>1</sup>，平川秀忠<sup>1</sup>，玉井清子<sup>2</sup>，谷本弘一<sup>3</sup>，富田治芳<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>群馬大 院医 細菌学、<sup>2</sup>株式会社ミロクメディカルラボラトリー、<sup>3</sup>群馬大 院医 薬剤耐性菌実験施設)

12:00～12:05

閉会の挨拶

11月15日（金）16:30～17:15

特別講演 抄録

**地方衛生研究所で行ってきた  
薬剤耐性菌に関する研究 ～行政的取り組み**

河原 隆二

(大阪健康安全基盤研究所 微生物部・細菌課)



## 地方衛生研究所で行ってきた薬剤耐性菌に関する研究～行政的取り組み

大阪健康安全基盤研究所  
微生物部・細菌課 河原隆二

世界的な薬剤耐性菌の増加により、グローバルな課題として「薬剤耐性菌との戦い」に各国が連携して取り組んでいくことが求められており、我が国でも2016年4月に「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」が策定された。このアクションプランでは、薬剤耐性菌のサーベイランスが対策の5つの柱の1つと位置づけられ、国の機関に加えて保健所・地方衛生研究所（地衛研）がそれを担っていく旨記載されている。2014年9月にカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症が感染症法5類疾患に加えられ、さらに2017年3月厚生労働省から「CRE感染症等に係る試験検査の実施について」の通知が出されたことにより、現在、感染症発生動向調査（NESID）の一環として主にCREを対象として各自治体の地衛研が薬剤耐性菌の病原体サーベイランスを行っている。

しかしながら、地衛研はもともと、行政的な位置付けが明確なもの、すなわち結核菌や、腸管出血性大腸菌やサルモネラといった腸管系感染症・食中毒に関連した病原細菌には強かったものの、薬剤耐性菌に関しては「何もしていなかった」のが実情であった。これは、かつての感染症法には薬剤耐性菌が対象疾患には含まれておらず、かつ、医療安全上の問題として捉えられており、行政的に関与することが難しかったことが大きな要因であった。

大阪健康安全基盤研究所（大安研）でも状況は同様であったが、地衛研の中では比較的規模が大きく、文部科研費などの外部研究費を申請できたこともあり、医療機関の医師や臨床検査技師の方々からの相談を受ける形で、「研究」として薬剤耐性菌を扱うことをスタートすることができた。ESBL産生腸内細菌科細菌の耐性遺伝子の同定からスタートし、その後、GES-5陽性カルバペネム耐性緑膿菌のアウトブレイク対応、ベトナムにおける食品由来薬剤耐性菌の調査研究（SATREPS）、大阪北部地域におけるCREの実態調査といった研究に参画することができた。さらにこれらの経験を生かし、地衛研全国協議会と国立感染症研究所が協同で運用するレファレンスセンターに参画し、感染研における研修や検査マニュアルの整備、地衛研で実施する検査法開発などCREにかかる検査体制の整備など、その活動の一端を担っている。

「薬剤耐性菌との戦い」を制するためには、今後、地域の医療機関、特に細菌検査室や感染制御チーム、さらに地域感染症対策ネットワークとの連携がますます必要となる。大安研では検査機能の拡充に加え、FETPの育成にも取り組んでおり、アウトブレイクが発生して多数の保菌者がいるが届出に該当しない場合、複数の医療機関から同じ耐性菌が検出されるような「地域内アウトブレイク」が見つかった場合など、従来の行政的対応からさらに踏み込んだアクションができないか、現在模索をしているところである。

本発表では、これまでに行ってきたこれらの研究や行政的取り組みについてダイジェストし紹介する。



# 一般演題抄録集



## 遺伝子系統解析による富山県で分離されたカルバペネマーゼ遺伝子を有しないカルバペネム耐性 *Klebsiella aerogenes* の特徴

○綿引正則<sup>1</sup>、内田薫<sup>1</sup>、松井真理<sup>2</sup>、鈴木里和<sup>2</sup>、中村雅彦<sup>3</sup>、彼谷裕康<sup>3</sup>、磯部順子<sup>1</sup>、大石和徳<sup>1</sup>

<sup>1</sup>富山県衛生研究所、<sup>2</sup>国立感染症研究所、<sup>3</sup>富山県立中央病院

【背景】感染症法において届出対象となるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症で分離される CRE は、カルバペネマーゼ産生株 (CPE) と産生しない株 (non-CPE) が存在し、届出株の半数以上は後者である。non-CPE の菌種としては *Klebsiella aerogenes* (*K.a*) が比較的多く報告されており、このような菌種のカルバペネム耐性は、AmpC β-ラクタマーゼ (AmpCBL) の過剰生産と外膜タンパク質の変化によるとされている。AmpCBL についてはボロン酸による阻害試験により、その産生が推定されるもののその実態についてはよく知られていない。また、平成 29 年、本県で CRE として届出された *K.a* は、16SrDNA 解析の結果、*K.a* と *Klebsiella* sp. (*K.sp.*) の 2 株が検出され、前者から PCR により *bla*<sub>ACT</sub> が検出されたが、これ以上の詳細な情報は得られなかった。そこで本県で CRE として検出された *K.a* の、①ボロン酸による阻止円拡張に関する遺伝的背景、および②平成 29 年に検出された CRE 2 株の分類学的特徴を明らかにするため、次世代シーケンサーによるドラフトゲノム配列を取得して、解析したので報告する。

【材料と方法】本県において CRE 感染症として届出された *K.a* 8 株を含む 11 株の Miseq 解読より得た配列と DDBJ から近縁種として *K.a* 24 株、*Klebsiella pneumoniae* (*K.p*) 25 株、*Klebsiella oxytoca* 13 株、*Klebsiella* spp. 6 株、*Enterobacter cloacae* 46 株、*Enterobacter* spp. 31 株、合計 156 ゲノム配列を用いた。遺伝子解析は、①AmpCBL 遺伝子(*ampC*)とその発現に関連する遺伝子 (*ramA*、*ampR*) の系統樹解析、②については、16SrDNA、*rpoB* 配列および近縁種の代表株 7 株とのコアゲノムによる一塩基多型(SNP)を利用した系統樹解析を実施した。解析には、RAST、nucmer、mafft、MEGA7、RA x ML-NG を用いた。

【結果】①*ramA*、*ampR* の系統樹解析では、*K.a* 由来の遺伝子は、*K.p* の遺伝子を含むクラスターと含まないクラスターを形成し、本県で検出された *K.a* 由来の遺伝子はいずれも後者のクラスターから検出された。*ampR* と隣接する *ampC* も 2 組存在し、本県で検出された *K.a* 8 株から 1 組は共通に検出され、うち 3 株はもう 1 組検出された。②16SrDNA から、*K.a* と *K.sp.*、*rpoB* の系統解析では、*E. cloacae* group に属していた。また、近縁種の代表株間と共通な 48 CDS から 8,229 SNP を抽出し、系統樹解析をしたところ、*E. cloacae* group に近縁であった。

【考察】①*K.a* の *ramA*、*ampR*、16SrDNA および *rpoB* について、本県で CRE として検出された *K.p* 由来の遺伝子はいずれも 1 つのクラスターに偏っていたこと、および本県の CRE *K.a* 8 株から検出された *ampR* と隣接する *ampC* とボロン酸で阻害される酵素との関連については今後検討する必要がある。②*K.a* の 16SrDNA による解析は、データベース上に分類が正確でない配列が存在しており、菌種を推定する場合には注意が必要である。CRE 感染症の報告に伴う地研の non-CPE の検査をどこまで実施するかは定まっていない。しかし、カルバペネマーゼ産生 *K.a* の文献的な報告もあり、今後注視するとともに、本研究の成果については今後医療機関への情報提供の際の参考としたい。

## 富山県で分離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の特徴

内田薫、綿引正則、金谷潤一、加藤智子、木全恵子、磯部順子、大石和徳  
(富山県衛生研究所細菌部)

### 【背景・目的】

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症は、カルバペネム系薬に対して耐性を示す腸内細菌科細菌による重要な感染症のひとつである。当所では、県内の医療機関で分離された CRE についてカルバペネマーゼ遺伝子の保有状況を調査している。

2015 年 4 月～2018 年 3 月の調査の結果、分離された菌種は、*Klebsiella aerogenes* が 65 株中 39 株と 60%を占めていた。遺伝子検査の結果、カルバペネマーゼ遺伝子保有株は 65 株中 3 株で、90%以上がカルバペネマーゼ遺伝子を保有しない株 (non-CPE 株) であった。non-CPE 株となった 62 株のうち 48 株について、ディスク法による  $\beta$ ラクタマーゼ産生性試験を実施したところ、42 株がボロン酸試験陽性となったが、そのうち 33 株からは AmpC  $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子 (*ampC*) は検出されなかった。

今回、遺伝子型は陰性であるが、表現型は陽性である CRE の特徴を明らかにするため、解析を行ったので報告する。

### 【方法】

富山県内の医療機関から分離された CRE 菌株のうち、*K. aerogenes* 7 株について、次世代シーケンサーを用いてゲノム解析を実施した。当所で構築した薬剤耐性遺伝子基盤データベースを利用し、カルバペネム耐性に関与していると考えられる *ampC* およびその上流にある AmpR 遺伝子 (*ampR*) との関連を調べた。さらに、これらの遺伝子を検出するためのプライマー設計と PCR を行い、ボロン酸試験結果との関連性を検討した。

### 【結果・考察】

*K. aerogenes* に注目したところ、*ampC* については 2～3 グループ、*ampR* については 2 グループに分類された。分類された *ampC*、*ampR* それぞれを検出するプライマーを用いた PCR の結果、2 系統の *ampC*、*ampR* が存在することが確認できた。しかし、ボロン酸試験結果との関連はみられなかった。

今後、表現型と遺伝子型の関連を調べ、non-CPE 株の特徴を明らかにしたいと考えている。

### 【謝辞】

菌株を分与していただいた県内医療機関の方々に深謝いたします。

## カルバペネム耐性腸内細菌科細菌病原体サーベイランスー2018年

○松井真理<sup>1</sup>、鈴木里和<sup>1</sup>、菅井基行<sup>1</sup>

1. 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター  
全国地方衛生研究所

【背景】2017年3月の通知（健感発0328第4号）に基づき、感染症法5類全数把握疾患であるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）感染症の届出症例より分離された菌株は、地方衛生研究所等でカルバペネマーゼ遺伝子等の試験検査を行い、結果を感染症サーベイランスシステム（NESID）の病原体検出情報システムに報告する病原体サーベイランスの対象となった。2018年CRE病原体サーベイランスの結果概要を報告する。

【方法】検体採取日が2018年1月1日～12月31日の株を対象に、通知で原則実施とされている、PCR法による主要なカルバペネマーゼ遺伝子（IMP型、NDM型、KPC型、OXA-48型）の検出結果を集計した。さらに、任意検査項目とされるカルバペネマーゼ遺伝子（VIM型、GES型、IMI型、KHM型、SMB型）検出報告も集計に加えた。

【結果】報告株数は1,684株（2019年6月28日現在）であり、2018年の発生動向調査届出数（患者報告）2,289例（2019年5月31日現在）の約70%の患者分離菌株の試験結果が報告されたと考えられた。分離患者の年齢性別、分離検体の分布は患者報告とほぼ同様で、菌種は、*Klebsiella aerogenes*（n=631, 38%）、*Enterobacter cloacae*（n=460, 27%）、*Klebsiella pneumoniae*（n=168, 10%）、*Escherichia coli*（n=154, 9%）、*Serratia marcescens*（n=80, 5%）の順に多く、その分布も患者報告とほぼ同様であった。

1,684株のうち、いずれかのカルバペネマーゼ遺伝子が検出された株は297株（18%）であり、その割合は2017年の28%より低かった。カルバペネマーゼ遺伝子検出株の遺伝子型内訳は、IMP型が254株（86%）と大半を占め、NDM型31株（10%）、KPC型10株（3%）、OXA-48型3株（1%）と続いた。任意検査項目の遺伝子は、GES型2株、IMI型1株が報告された。IMP型検出254株の菌種は、全国では*E. cloacae*（n=82, 32%）、*E. coli*（n=64, 25%）、*K. pneumoniae*（n=63, 25%）の順に多いが、関東甲信静では*E. cloacae*の割合が顕著に多い（61%）のに対し、近畿は*E. coli*（55%）が最も多く、2017年の同サーベイランス報告と同様の明らかな地域差を認めた。

【考察】CRE病原体サーベイランスが開始された2017年は、患者報告の約半数より分離された菌株の検査結果が報告されたのに対し、2018年は約70%に増加した。検査報告率が異なるため直接比較はできないものの、カルバペネマーゼ遺伝子検出株の割合が2018年に低下した一つの要因として、分離菌種に占める*K. aerogenes*の割合が増加したことが考えられた。

## 感染症発生動向調査病原体サーベイランスにおける海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株の報告状況

○鈴木里和<sup>1</sup>、松井真理<sup>1</sup>、菅井基行<sup>1</sup>

1. 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター  
全国地方衛生研究所

【背景】2017年3月より開始されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）病原体サーベイランスでは、国内分離株の多くを占めるIMP型のほか、NDM型、KPC型、OXA-48型といった主に海外で蔓延しているカルバペネマーゼの遺伝子についても報告されている。2010年代前半、これらの海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株の多くが直近の海外渡航歴をもつ患者より分離されていた。しかし2010年代後半に入り、海外型カルバペネマーゼ産生菌の国内伝播例や院内感染事例が報告されるなど、その疫学が変化しつつあり、CRE病原体サーベイランスにおける海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出状況を報告する。

【方法】集計対象は2019年6月28日現在の病原体検出情報システム報告情報のうち、検体採取日が2017年1月1日～12月31日の899株および2018年1月1日～12月31日の1,684株とした。対象株には感染症発生動向調査に基づくCRE感染症届出症例以外の患者分離株も一部含むと思われる。海外渡航歴無し・不明患者由来株からの海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出は、精度管理のためPCR増幅産物等のシーケンスによる結果確定を報告自治体に依頼した。

【結果】2017年は検査結果が報告された899株のうち13株（1.4%）が海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株であったのに対し、2018年のそれは1684株のうち42株（2.5%）と増加していた。これらを報告した都道府県数は2017年が大都市を中心とする6都県であったのに対し、2018年は16都道府県と全国に拡大していた。

報告患者の海外渡航歴の有無別にみると2017年は13株のうち8株（62%）が渡航歴無しまたは不明であったのに対し、2018年は42株中33株（79%）となっており、国内例と思われる症例の増加を認めた。遺伝子型別にみると2017年、2018年共にNDM型が最も多く、次いでKPC型、OXA-48型となっていた。NDM型カルバペネマーゼ遺伝子検出株のうち海外渡航歴無し・不明患者由来17株は遺伝子型別結果が報告されており、NDM-1が2株、NDM-5が15株であった。一方で、2017年の海外渡航歴無し・不明患者由来の5株はすべてNDM-1であった。

【考察】NDM型を中心とした海外型カルバペネマーゼ遺伝子検出株増加の背景には、アジア諸国におけるカルバペネマーゼ産生菌の蔓延とこれらの地域からの持ち込みおよび国内伝播の増加があると考えられる。国内での蔓延を防ぐためには、CRE分離時に適切なリスク評価を各医療機関が実施する必要がある。CRE病原体サーベイランス結果はその基本となる情報であるため、今後も迅速に還元していく必要があると思われた。

# NDM 検出歴のない医療機関の病棟シンクから検出された NDM-1, OXA-820 カルバペネマーゼ産生 *Acinetobacter pittii* ST220 の全ゲノム解析

林航<sup>1</sup>, 田中隼斗<sup>2</sup>, 新井恵理子<sup>3</sup>, 名取達矢<sup>3</sup>, 堀内一樹<sup>3</sup>, 松本剛<sup>3</sup>,  
飯村将樹<sup>2</sup>, 曾我英司<sup>2</sup>, 長野由紀子<sup>4</sup>, 長野則之<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>信州大学大学院総合医理工学研究科, <sup>2</sup>信州大学大学院医学系研究科,  
<sup>3</sup>信州大学医学部附属病院臨床検査部, <sup>4</sup>名古屋大学大学院医学系研究科

【目的】国内ではNDM型カルバペネマーゼ産生菌の検出はいまだ希であるが, そのほとんどが渡航歴や海外での治療歴を有する患者からの輸入事例として報告されている。本報では医療機関の病棟環境から検出された NDM-1 産生 *Acinetobacter pittii* の解析知見を報告する。

【材料と方法】OXA-48型カルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* の検出事例に基づく病棟内環境調査により洗浄用シンクから検出された NDM-1 産生 *A. pittii* の耐性機序及び遺伝的背景の解明を目的に全ゲノム解析を行った。

【結果】本菌は16S rRNA, *rpoB* 遺伝子配列解析により *A. pittii* と同定された。*A. pittii* はイミペネム, メロペネム(MIC>8 µg/mL)をはじめ全てのβ-ラクタム系薬に耐性を示したのに対し, アミノグリコシド系薬, キノロン系薬, ミノサイクリン, ST合剤には感性を示した。Pasteur scheme による sequence type は ST220 と同定された。本菌が保有する *bla*<sub>NDM1</sub> は *Acinetobacter* 属に特有の VirBIV 型分泌系を持つプラスミド pSU1805NDM (総塩基配列長 41,022 bp) に担われていた (Fig.)。 *bla*<sub>NDM1</sub> の上流には挿入配列 IS*Aba125* が, 下流には *ble*<sub>MBL</sub> が存在していた。さらに IS*Aba125* の上流には aminoglycoside 3'-phosphotransferase をコードする *aphA6* が連結して存在していた。pSU1805NDM は既報の中国で分離されたヒト糞便由来 *A. lwoffii* 保有プラスミド pNDM-JN02 および米国で分離された *A. baumannii* 保有プラスミドと高い配列類似性を示した。また, 本菌の染色体上には OXA-213 family カルバペネマーゼ遺伝子に属する *bla*<sub>OXA820</sub> の存在が確認され, 構造遺伝子を含む 12,265 bp の周辺配列が中国のヒト喀痰由来 *A. pittii* ST220 の相応配列と 99.99%一致していた。また, 染色体性の AmpC 遺伝子として *bla*<sub>ADC43</sub> が確認された。

本菌の病原遺伝子の解析結果, 上皮細胞への付着・浸潤やバイオフィルムの形成に関わる *ompA* 及びバイオフィルムを構成する主要多糖類 PNAG をコードする *pgaABCD* オペロンに加え, I型線毛を形成させ非生物面でのバイオフィルム形成に重要な役割を果たす *csuA/B/C/D/E* オペロンとそれを制御する二成分制御系因子 *bfmS/bfmR* を保有していた。さらに, 固相表面上での twitching 運動に必要なIV型線毛関連遺伝子として *pil* 遺伝子群を保有していた。

【考察】国内では最近, 海外渡航歴のない患者からの NDM 型カルバペネマーゼ産生菌の検出例が散見され始めている。われわれは NDM 産生菌の検出事例のない医療機関の病棟環境から初めて NDM-1 産生 *A. pittii* を確認した。*A. pittii* は自然環境に生息する菌種であり, バイオフィルムおよび線毛形成を介し医療環境への定着が可能となる。本事例は医療環境を含む環境中に既に NDM 産生 *Acinetobacter* spp. が存在していることを示唆しており, 国内の AMR 対策の再考を促すものである。

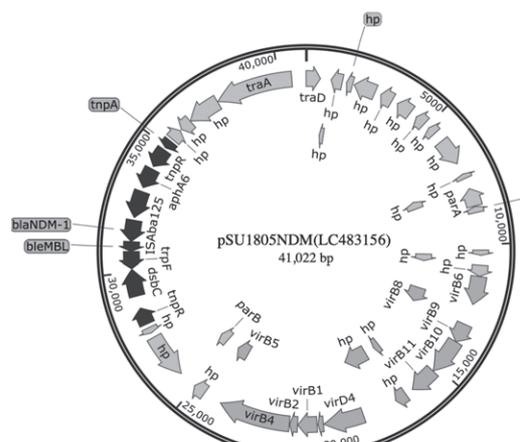


Fig. Circular genetic map of *A. pittii* SU1805 plasmid pSU1805NDM.

## 海外渡航歴のない患者から検出された NDM-5 メタロ-β-ラクタマーゼを産生する 広範囲抗菌薬耐性 *Escherichia coli* ST746 の解析

田中隼斗<sup>1</sup>, 新井恵理子<sup>2</sup>, 鈴木眞<sup>2</sup>, 林航<sup>3</sup>, 飯村将樹<sup>1</sup>, 曾我英司<sup>1</sup>, 長野由紀子<sup>4</sup>, 長野則之<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科, <sup>2</sup>信州大学医学部附属病院 臨床検査部,

<sup>3</sup>信州大学大学院 総合医理工学研究科, <sup>4</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】国内における NDM 産生菌の報告は海外からの輸入事例が主であったが, 近年, 海外渡航歴のない患者からの報告が散見され AMR 対策の観点から注目される。本報では海外渡航歴のない患者の入院時スクリーニングで検出された広範囲抗菌薬耐性 *Escherichia coli* の解析知見を報告する。

【材料と方法】50 歳代女性の糞便より分離されたコリスチンを除く全ての抗菌薬に耐性を示す *E. coli* を対象に遺伝系統解析を行った。分離株から精製したプラスミド DNA を *E. coli* DH10B に導入後イミペネム (IPM), アミカシン (AMK), ミノサイクリン (MINO) 含有培地で各々選択して得られた形質転換株のプラスミド Inc 型別, 耐性遺伝子及び周辺領域の解析を行った。また, チゲサイクリン (TGC), レボフロキサシン (LVFX) の耐性機序の解明を試みた。

【結果と考察】*E. coli* は phylogroup A, ST764 (clonal complex 10) と同定され, IncX3, IncF 及び型別不能の 3 種のプラスミドを保有していた。IPM 選択で得られた形質転換株はアズトレオナム (AZT) を除く β-ラクタム系薬に耐性で IncX3 プラスミドを保有していた。この IncX3 プラスミド上には *bla*<sub>NDM-5</sub> (IS5-ΔISAba125-*bla*<sub>NDM-5</sub>-*ble*<sub>MBL</sub>) が担われていた。AMK 選択で得られた形質転換株は第 3, 4 世代セファロスポリン系薬, AZT, アミノグリコシド系薬, ホスホマイシン, ST 合剤に耐性で, IncF プラスミドを保有していた。この IncF プラスミド上には *bla*<sub>CTX-M55</sub> (IS26-ΔISEcp1-*bla*<sub>CTX-M55</sub>-*orf477*-Δ*bla*<sub>TEM-1</sub>-IS26-*fosA3*) に加え, スルホンアミドの耐性に関わる *sul2* 及びアミノグリコシド高度耐性に関与する *rmtB* (*bla*<sub>TEM-1</sub>-*rmtB*-IS26) など多数の薬剤耐性遺伝子が担われていた。MINO 選択で得られた形質転換株はテトラサイクリン耐性で, *tet(M)* を担う型別不能のプラスミドを保有していた。なお, これらの形質転換株は TGC, LVFX に感性であった。TGC 耐性機序解析の結果, *tet(X)* は保有していなかったが, 多剤排出ポンプ AcrAB-TolC の転写制御因子である MarR にアミノ酸置換 (G104C) が認められた。さらに *acrAB* の負の制御因子遺伝子である *acrR* に IS1 family が挿入され構造遺伝子が破壊されていた。これらにより排出ポンプの過剰発現がおり TGC に耐性を示したことが推定される。また, キノロン耐性決定領域 QRDR の GyrA に S83L と D87N, ParC に S80I のアミノ酸置換が認められた。

NDM 型酵素は NDM-1 から -24 までのバリエーションが報告され, NDM-5 は NDM-1 と比べ 2 アミノ酸違い (V88L, M154L) であり, カルバペネム系薬に対する加水分解活性がより高いことが知られている。本菌は *bla*<sub>NDM-5</sub> に加え, 種々抗菌薬耐性遺伝子を担う複数のプラスミドを保有しており, さらに TGC にも耐性を示した。広範囲抗菌薬耐性 *E. coli* の出現は臨床治療上及び AMR 対策上重大な懸念となる。

ミャンマーの医療施設で分離されたカルバペネム耐性 *Enterobacter cloacae* complex

○大城聡<sup>1</sup>、多田達哉<sup>1</sup>、内田大貴<sup>1</sup>、菱沼朋美<sup>1</sup>、San Mya<sup>2</sup>、Htay Htay Tin<sup>2</sup>、切替照雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>順天堂大学医学部微生物学講座

<sup>2</sup>National Health Laboratory, Yangon, Myamnar

## 【背景】

地球規模で拡大している薬剤耐性菌が地球規模で新興・拡大している。特にカルバペネム耐性菌の新興は開発途上国の医療安全を脅かしている。我々は2015年から、ミャンマー国立衛生研究所と共同で薬剤耐性菌の分子疫学研究を実施している。本研究では、ミャンマー国内の医療施設で分離したカルバペネム耐性 *Enterobacter cloacae* complex の細菌学的・遺伝学的解析結果を報告する。

## 【材料と方法】

2015年10月から2017年5月にミャンマー国内11医療施設からカルバペネム耐性 *E. cloacae* complex を31株分離した。これら株に関して、薬剤感受性試験を行い、次世代シーケンス (Miseq および MinION) による全ゲノム解析を行った。また、得られたデータを用いて、ResFinder による薬剤耐性遺伝子の同定、Multilocus sequence typing (MLST) の決定及びプラスミドの比較解析を実施した。

## 【結果及び考察】

カルバペネム耐性 *E. cloacae* complex 31株の薬剤感受性試験の結果、17株はアミカシン ( $\geq 64\mu\text{g/ml}$ ) およびシプロフロキサシン ( $\geq 4\mu\text{g/ml}$ ) にも耐性を示すことが分かった。average nucleotide identity (ANI) および digital DNA-DNA hybridization (dDDH) による *in silico* 解析から、17株中16株が *E. xiangfangensis* (ST200) であり、残り1株は *E. minipresuralis* (ST=ND) であることを確認した。*E. xiangfangensis* ST200株はサーベイランスを実施したミャンマー国内5地域すべてから分離され、主に尿サンプルから検出している。Miseq のショートリードと MinION のロングリードをアセンブリした全ゲノム解析の結果、*E. xiangfangensis* ST200株はカルバペネマーゼをコードする *bla*<sub>NDM-1</sub>、16S rRNA メチラーゼをコードする *ArmA* および *rmtC* を保持しており、さらに、ヤンゴン市内の近隣2医療施設で分離した株からは *rmtE* も検出した。また、*ArmA* は染色体にあり、*bla*<sub>NDM-1</sub>、*rmtC* は同じプラスミド (5.7Kbp)、*rmtE* は別のプラスミド (120kbp) 上に局在することを。見出した。

本研究の結果、多剤耐性 *E. xiangfangensis* ST200 がミャンマー国内の医療施設において尿路感染により流行している可能性が示唆された。また、これら菌株は、複数の薬剤耐性プラスミドを持っていた。今後も、ミャンマー国内で流行するカルバペネム耐性 *E. cloacae* complex および薬剤耐性遺伝子の伝播・拡大を監視する必要があると考えている。

## 妊婦におけるβ-ラクタム系低感受性B群レンサ球菌の発見

半田市立半田病院<sup>1</sup>、名古屋大学大学院 医学系研究科 分子病原細菌学<sup>2</sup>

名古屋大学大学院 医学系研究科 産婦人科学<sup>3</sup>、医療法人 葵鐘会<sup>4</sup>

諸井 博明<sup>1,2,3</sup>、木村 幸司<sup>2</sup>、小谷 友美<sup>3</sup>、津田 弘之<sup>3</sup>、坂野 弘嗣<sup>2</sup>、金 万春<sup>2</sup>、和知野 純一<sup>2</sup>、  
山田 景子<sup>2</sup>、三井 崇<sup>4</sup>、山下 守<sup>4</sup>、吉川 史隆<sup>3</sup>、荒川 宣親<sup>2</sup>

### 【背景】

B群レンサ球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS, *Streptococcus agalactiae*) は新生児において予後不良の重篤な感染症を引き起こす原因菌である。本邦では分娩時の母児垂直感染予防のために妊娠中のGBSスクリーニング検査と、陽性妊婦への予防的抗菌薬投与が推奨され、この予防投与の第一選択薬としてペニシリン系抗菌薬が推奨されている。

これまでGBSはペニシリンを含むβ-ラクタム系抗菌薬に感性与されてきたが、2008年木村らによってペニシリン低感受性B群レンサ球菌 (GBS with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) が確認された。現在ではPRGBSを含め、β-ラクタム低感受性GBS (GBS with reduced β-lactam susceptibility, GBS-RBS) と呼称されている。今回我々は妊婦由来のGBS分離株を用いてその薬剤感受性試験を実施し、妊娠女性におけるGBS-RBSの現状を調査した。

### 【方法】

名古屋大学医学部附属病院及び協力施設において、妊娠33週～37週での健診時にGBSスクリーニング検査を実施し、陽性例から菌株を分離し集積した。

分離された菌株は、β溶血性、血清凝集反応、PCR法による特異的遺伝子検出により、GBSであることを同定した。各菌株の莢膜型を血清凝集反応及びPCR法にて確定した。同定された各菌株に対し、寒天平板希釈法を用いて7種のβ-ラクタム抗菌薬の最少発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) を測定した。β-ラクタム系薬に対するMIC上昇を認めた菌株について、ペニシリン結合タンパク (Penicillin-Binding Protein, PBP) のアミノ酸変異の有無をDNAシーケンスにて解析するとともに、MLST及びeBURSTを用いて遺伝的類似性を検討した。

### 【結果】

対象妊婦4530例のうちGBS陽性であったのは477例であった。莢膜型の分布はIa:14%、Ib:16%、II:7%、III:22%、IV:4%、V:18%、VI:11%、VII:1%、VIII:3%、non-typable:4%であった。このうち5株にセフチブテン感受性の低下を認めた。これらはいずれもPBP2Xのアミノ酸変異を獲得しており、これまでに報告されたPRGBSのアミノ酸変異の一部と共通していた。5株の莢膜型及びMLST、eBURSTで解析した遺伝的背景に共通点は認められなかった。更に5株のPBP2Xアミノ酸置換を有する遺伝子組換え株4株を作成し、これらのMICを測定したところ、セフチブテンおよびセフチゾキシムへの感受性低下が認められた。

### 【考察】

今回、我々は妊婦由来のGBSから少なくとも5株のGBS-RBSを分離することができた。これらはこれまでに報告されたPRGBSと一部共通するPBPのアミノ酸変異を獲得しており、妊婦におけるGBSでもβ-ラクタム低感受性株が出現しつつあることが確かめられた。

## プラスミド系統ネットワーク解析の原理と特徴

鈴木匡弘<sup>1</sup>、土井洋平<sup>1</sup>、荒川宜親<sup>2</sup>

<sup>1</sup>藤田医科大学医学部微生物学講座、<sup>2</sup>名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学

プラスミドはコアとなる遺伝子が少ない、あるいは存在しないため系統解析が困難であった。そこで、プラスミドを構成する ORF の有無による系統ネットワーク解析(ORF-based Binarized Structure Network Analysis of Plasmids, OSNAp)を試みた。

大腸菌、肺炎桿菌、サルモネラ等 1217 株の全ゲノムデータから 98 個の IncI1 プラスミド、及び代表的な IncI1 プラスミドとして R64、ColIb-P9、R621 のシーケンスデータを用いた。アノテーション情報に従って ORF を抽出し、同一 ORF を取り除くことで、重複のない ORF セットを作成した。各々のプラスミドをこのセット中の ORF の有無によって 1,0 からなる binary sequence に変換した。SprintsTree を用いて binary sequence から Neighbor-net を作成した。プラスミド間の距離の指標として binary sequence から Dice 係数を算出した。また、pMLST による ST 型を対照とした。

ST 型が決まらないプラスミドも含め、全てのプラスミドは Neighbor-net 上に配置され、近縁関係を俯瞰できた。同一 ST 型のプラスミドの多くは Neighbor-net 上では近い位置に配置され、Dice 係数は 0.95 以上となった。

OSNAp は ORF の有無による系統解析であるため、コア構造を必要としない。今回は比較対照の ST 型が多数登録されている IncI1 プラスミドを用いたが、他のプラスミドグループでも系統解析可能である。Neighbor-net は近縁関係を視覚的に把握しやすく、共通祖先からの分岐による説明が適当でないプラスミドの系統解析として望ましい手法の一つと考えられる。Neighbor-net は進化系統を正確に反映しているとは限らないことに注意する必要があるが、プラスミド間の関係を示すことが可能になり、系統解析に貢献すると期待される。

## 「Super 2DCM」の開発

藤本修平<sup>1)</sup>, 村上啓雄<sup>2)</sup>, 荒川宜親<sup>3)</sup>, 柴山恵吾<sup>4)</sup>

1) 東海大学, 2) 岐阜大学, 3) 名古屋大学, 4) 国立感染症研究所

【背景】耐性菌の院内拡散を可視化する方法として、2DCMを開発し、2DCM-webとして公開してきた。さらに、地域拡散に対応する複数施設解析版2DCM-webを開発、公開している。2DCMでは、最初に感受性パターンから検査誤差を配慮して2つの菌株が同じ株である可能性が「ある」か「ない」か(以下「ある」「ない」)を全ての分離株の組み合わせで判定する。その後、どの2株をとっても「ある」と判定される株からなるグループを作る。このような全ての要素がお互いに線(定義された関係)で結ばれる集合は完全グラフと呼ばれ、要素数が増えると検索が急速に困難になることが知られている。その主な原因は、総当たりで「ある」かどうかを調べる作業にあるが、2DCMの開発の段階でn個の要素からなるグループ $A_n$ からn+1個の要素からなる全てのグループ $A_{n+1,1} \sim A_{n+1,k}$ を作ることができた場合、n+2個のグループを作るために $A_{n+1,x}$ に加えることのできる要素は、 $A_{n+1,1} \sim A_{n+1,k}$ を作るために $A_n$ に最後に加えたk個の要素であって、かつ $A_{n+1,x}$ にn+1番目として最後に加えた要素と「ある」と判定されるものだけであることを見いだして実用化した。これらk個の要素はすでに $A_n$ の全ての要素と「ある」の関係である要素をもれなく含むことが分かっているので、後は、 $A_{n+1,x}$ に最後に加えた要素と「ある」であることをしめせばn+2個目の要素となるからである。2DCMでは、「ある」「なし」およびグループに含まれる要素をそれぞれ2次元配列で持っていたため、多くのメモリーを消費し、元株数で1,000株程度が解析の限界になっていた。このため、全国データの年間データ、地域レベルでも年余にわたる分離株を同じ基準でグループ分けすることができなかった。JANIS1年分のデータで耐性菌の拡散を可視化できる方法としてSuper 2DCMの開発を行った。

【方法】n=2からn-1個の要素と「ある」と判定される要素の番号のみを1次配列に入れるようにした。n-1個のどの要素と「ある」のか示すための1次ポインターと、n個に対応する要素がどこから始まるのかを示す高次ポインターを設けた。2つの要素が「ある」かどうかはn=2で1次配列の最初の部分に納められる。たとえば、冒頭には1の要素と「ある」の要素が並び、次には2の要素と「ある」の3以降の要素が並び、1次ポインターにはそれらの境の位置が記録される。n+1個のグループを作るときに参照されるのは、n個のグループを作るときに追加された要素を納める最後の配列とそれらが「ある」かどうかを示す冒頭部分の配列だけである。「ある」かどうかは該当部分を2分探索して得た。

【結果】乱数を用いてSIRがほぼ同数含まれる20薬

剤100,000株の模擬データを作成し検証を行った。小型のワークステーションを用い7時間でグループ化が終了した。JANISデータMRSA1年分430,536株、VRE10年分7,400株の解析を試みた。いずれも途中でグループ数が5億を超えた。MRSAでは194種類、VREでは216種類の抗菌薬が感受性検査に使用されており、大多数はごく一部の株でのみ調べられていた。残りの株では「調べると同じかも知れない」という判断になり、グループ数を激増させる原因になっていた。「検査してある株数」/全株数を採用率(AR)として導入しARの低い薬剤を処理から除外するアルゴリズムを加えた。MRSAでは、AR=0.7で8薬剤に、VREではAR=0.6で6薬剤になり、それぞれ最大19感受性パターンを含む2,300,801グループ、同14、3,683が得られた。MRSAは47都道府県、1,828医療機関の215,803人から分離され、もとのSIRのパターン数は1,144、含まれるグループの組み合わせパターン数は898であった。一方、VREではそれぞれ39, 217, 2,049, 127, 121であった。

【考察】Super 2DCMの根幹となるグループ化についてはJANIS全国データレベルの処理が可能になった。このアルゴリズムを導入することで、1医療機関、地域レベルの長期データをグループ化し、同じグループの基準で期間を区切って2DCMで表示することは現行技術で可能である。しかし1,000株以上のデータを分かりやすく1枚の図に示すためには、新たな表示用法の開発が必要である。含まれるグループのパターンを認識するアルゴリズムの検討を始めている。データ量が増えるに従って、より大きなグループに完全に包含されるグループの排除に多くの時間が必要になることが分かった。ネットワーク工学で極大クリークの探索に関する研究が行われている。クリークとはネットワーク内にある完全グラフのことであり、極大クリークとはそのうちの最大のものを指す。極大クリークの探索では小さなクリークを避ける工夫がなされており、これが、完全に包含される完全グラフの排除に利用できる可能性があり検討課題である。

【まとめ】JANIS1年分のデータで耐性菌の拡散を可視化するSuper 2DCMの開発を行った。中核となるグループ化については実装可能なアルゴリズムを開発できた。既存技術で、同じ基準でグループ化したデータを分割して表示する事に利用できるが、全体を俯瞰できるようにするための研究開発が今後必要と考えた。開発したグループ化のアルゴリズムは、遺伝子型による分類を含むさまざまなグループ作成への応用が期待できる。

## JANIS・細菌検査データを活用した研究の事例と展望

○矢原耕史1, 筒井敦子1, Adam Clark2, 藤本健一3, 川上小夜子1, 千酌浩樹4, 井口光孝5, 八木哲也5, Meghan A. Baker 6, Thomas O' Brien 2,7, John Stelling 2,7

宮本直樹8, 堀田吏乃8, 矢野知美8, 田代尚崇8, 森井大一10, 八板謙一郎8,9, 渡邊浩8,9, 柴山恵吾10

- 1) 感染研・薬剤耐性研究センター.
- 2) WHO Collaborating Centre for Surveillance of Antimicrobial Resistance, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA.
- 3) 帝京大・公衆衛生.
- 4) 鳥取大病院・感染制御部.
- 5) 名古屋大・臨床感染統御学.
- 6) Harvard Medical School and Harvard Pilgrim Health. Care Institute, Boston, USA.
- 7) Harvard Medical School, Boston, , USA.
- 8) 久留米大学病院・検査室.
- 9) 久留米大学病院・感染制御部.
- 10) 感染研・細菌第二部

JANIS・細菌検査データを活用して行い、論文を発表した2つの研究を紹介する。

1つ目は、JANIS 検査部門データベースに蓄積されている日常的な薬剤感受性試験のデータを処理し、アウトブレイクの兆候の自動検出を試みた研究 (Tsutsui\*, Yahara\* et al, 2019, *J Hospital Infection*)。統計法の研究利用申請に基づいて2011年から2016年のデータの抽出・提供を受け、WHOが推奨するWHONETソフトウェアにそれをインポートし、WHONETに内蔵されているSaTScanアルゴリズムによる解析を行った。2016年のJANIS参加医療機関のうち約1000医療機関を対象にした解析の結果、統計学的に有意な患者の集積(以下、クラスター)として検出されたアウトブレイク候補のうち88%で、患者数は5人以下であった。また、そのうち72%で、アウトブレイクの続いた可能性のある期間は1カ月以内であった。一方、ブドウ球菌と大腸菌について、1カ月を超えるクラスターは、200床未満の医療機関で有意に高頻度に検出された。次に、こうしてアルゴリズムによって自動検出されるクラスターの妥当性を検証するために、10医療機関(500床以上が3, 200床未満が3, その他が4)を対象に、2011年から2016年のデータから自動検出されたクラスターについて、各医療機関の担当者への聞き取りを含む更なる分析を行った。その結果、その約80%は、感染制御スタッフに認識されておらず、28%は介入の必要性のあったものであった。2つの医療機関では、感性菌によるクラスターが耐性菌によるクラスターに先立って検出されていた。感性菌によるクラスターを早期に自動検出することは、早期な介入による耐性菌の制御に役立つ可能性が考えられた。

2つ目は、医療機関がJANISに提出しているデータと患者の臨床・予後情報を結合して行った、MRSA菌血症に関する臨床疫学研究である (Miyamoto, Yahara et al, (2017), *J Infect Chemother*)。MRSA感染症の治療ガイドラインでは、菌血症治療において、培養陰性化の確認が重要だとされている。本研究では、ガイドラインに従った陰性化の確認がどれだけ行われており、それが患者予後にどう影響するかを明らかにする。2011年3月～2016年5月の間に久留米大学病院に入院し、MRSAが血液培養検査で2セット以上検出された患者のうち、DPCデータを連結し退院時情報を取得できた64人を対象とし、初回陽性日から生存退院または死亡までの時間と転帰を目的変数、再検査による陰性化の確認の有無を説明変数として、生存時間解析(Kaplan-Meier法および多重Cox回帰分析)を行った。64人中46人(71.9%)で再検査による培養陰性化の確認が行われていた。初回陽性日から14日生存率は、陰性化確認群では100%だが、陰性化非確認群では47.4%であった。14日以内に陰性確認できなかった場合の死亡リスク比(患者背景調整済)は、再検査が行われた患者群で3.23(95% CI 1.06-9.88)と推定された。本研究が初めて示した、細菌検査データとDPCデータの統合によるアプローチと結果は、MRSA菌血症における培養陰性化確認の重要性のエビデンスを示す上で有効である。このアプローチを、耐性菌株の全国サーベイランスに生かす展望についても、時間が許せば紹介したい。

## WHO-GLASS と JANIS の集計方式の相違に関する検討

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター<sup>1</sup>、細菌第二部<sup>2</sup>

<sup>1</sup>梶原 俊毅、<sup>1</sup>矢原 耕史、<sup>1</sup>平林 亜希、<sup>1</sup>安齋 栄子、<sup>1</sup>若井 知世、<sup>2</sup>柴山 恵吾、<sup>1</sup>菅井 基行

**【目的】**2015 年に WHO が採択した Global Action Plan 2015 を基に、世界規模の薬剤耐性サーベイランス Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (以下 GLASS)が開始された。その特徴の一つは、同一患者から複数採取されたデータの重複処理を、血液や尿などの検体別に行うことを各国に求めている点にある。日本国内では、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(以下 JANIS)が 2000 年から実施され、2019 年 1 月時点で検査部門に 2,120 病院が参加しているが、そこでの重複処理の方法は GLASS と異なる。本研究は、両者の相違点を整理した上で、その違いが薬剤耐性サーベイランスデータの集計結果に及ぼす影響を明らかにする。

**【方法】**2017 年の JANIS 検査部門年報の集計対象となった 1,795 医療機関より得られた約 800 万検体のデータを、統計法の研究利用申請に基づき、GLASS 方式と JANIS 方式の重複処理を行ってそれぞれ集計し、検体種別、入院外来、年齢群別に、患者数及び主要薬剤の耐性率の集計値を比較した。GLASS 方式は、集計期間(1 年)の中で、ある菌種が同一患者から複数回検出された場合に、血液、尿等の検体別に最初に検出された菌を対象として、検体別の株数(=患者数)を集計する方式である。JANIS 方式は、検体の種類を問わず、患者から 30 日単位で最初に検出された菌を対象として、該当菌の分離された患者数を集計する方式である。さらに JANIS 方式では、30 日以内に再度検出された菌であっても、その感受性に 2 管以上差異があった場合には、異なる菌株として追加でカウントするという工夫が加えられている。

**【結果】**JANIS 方式での重複処理を行った場合では GLASS 方式と比較し、血液検体を採取された患者数と尿検体を採取された患者数は共に、1 年あたり 10 万人以上少なくなった。尿検体ではその差が顕著であり、1 年あたり 277,000 人以上少なくなった。年齢群分けを行うと、その傾向は高齢者に顕著であった。特に 65 歳以上の尿検体では 200,000 件以上の差異を認めた。薬剤耐性率については、薬剤感受性の差異を考慮して異なる菌株を追加でカウントした場合のほうが差異は大きかったが、差異は最大でも大腸菌の LVX において 3.2%で、他の薬剤での耐性率の差はそれ以下であった。

**【結論】**JANIS と GLASS の重複処理の違いが、薬剤耐性率の集計値に与える影響は軽微である。今後 GLASS の集計方式が世界標準となったとしても、薬剤耐性率については、JANIS の従来の方式で集計された値は国際的に比較可能なものである。

## 二本鎖 DNA 修飾色素およびナノポア DNA シークエンサーを用いた薬剤耐性菌同定技術

大野 歩<sup>1</sup>、梅澤和夫<sup>2</sup>、クリュコフ キリル<sup>1</sup>、中川 草<sup>1</sup>、浅井さとみ<sup>3</sup>、宮地勇人<sup>3</sup>、今西 規<sup>1</sup>

1. 東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学
2. 東海大学 医学部 外科学系 救急救命医学
3. 東海大学医学部基盤診療学系 臨床検査学

**【背景】**細菌感染症の治療において、細菌の同定と薬剤感受性試験は、抗菌薬を決定するための非常に重要な検査である。その一方で、培養法は結果が確定されるまでに数日を要するため、初回の抗菌薬投与は経験的治療にならざるを得ない。また、抗菌薬の効果判定は一般的に投与 3 日後以降に行い、菌株の薬剤感受性結果を参考に抗菌薬使用を再検討しているが、培養陽性率は低く、経験的治療が継続される症例も多い。近年、遺伝子診断法による細菌同定法が報告されているが、常在菌による汚染や死菌の混入により有意菌の同定は困難である。本研究では、Propidium monoazide (PMA)を用いて生菌の鑑別を行い、抗菌薬曝露により薬剤感受性を同定する迅速遺伝子検査法の開発を目指した。

**【方法】**検討には、大腸菌 ATCC 株(25922)および緑膿菌 PAO1 株、多剤耐性緑膿菌 MDRP 株を用いた。菌株を培養後、 $2 \times 10^6$  cfu/50 $\mu$ L に調製し、調製菌液の菌株単独液、もしくは ATCC 株と PAO1 株または MDRP 株の混合液を用意した。それぞれにアンピシリン(16 $\mu$ g/mL)またはゲンタマイシン(32 $\mu$ g/mL)を添加、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、PMA 反応後に 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、ナノポア DNA シークエンサーで配列決定することにより、抗菌薬に耐性を示した生菌のゲノム検出を試みた。

**【結果および考察】**ATCC 株、PAO1 株または MDRP 株の各々単独液と抗菌薬の検討では、アンピシリン存在下では ATCC 株の、ゲンタマイシン存在下では ATCC 株および PAO1 株の菌数の減少が認められ、これまで報告されている薬剤感受性と同様であることが確認された。さらに ATCC 株と PAO1 株または MDRP 株の混合液を用いて、ナノポア DNA シークエンサーによりサンプル中の菌組成を確認した結果、ATCC 株がアンピシリン存在下で最大 85.5%、ゲンタマイシン存在下で最大 96%の減少を示し、PAO1 株(アンピシリン耐性)または MDRP 株(アンピシリンおよびゲンタマイシン耐性)の菌組成との明らかな差が認められた。本法により、細菌の同定のみならず治療に有用な薬剤感受性の傾向を同時かつ迅速に判定可能な検査法の確立が期待される。

## A novel LAMP method detecting $\beta$ -lactamase genes

Mitsuko Seki<sup>1,2</sup>, Chika Takano<sup>2</sup>, Eun Jin Kim<sup>1,3,4</sup>, Yeong Bae Yoon<sup>1,3,4</sup>, Dong Hyun Lee<sup>1,3,4</sup>, Jiwon Lee<sup>1,3,4</sup>, Yeong Jun Baek<sup>1,3,4</sup>, Satoshi Hayakawa<sup>2</sup>, Tomonori Hoshino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Pediatric Dentistry, Department of Human Development and Fostering, Meikai University School of Dentistry, Sakado, Japan

<sup>2</sup> Division of Microbiology, Department of Pathology and Microbiology, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Hanyang University, Ansan, South Korea

<sup>4</sup> Institute of Pharmacological Research, Hanyang University, Ansan, South Korea

Nosocomial infections caused by  $\beta$ -lactamase-producing strains are of growing concern globally. Several genotypes of the Guiana extended spectrum (GES)  $\beta$ -lactamase gene (*bla*<sub>GES</sub>) include a single missense mutation, a change from G to A at nucleotide position 493 (G493A) that changes glycine to serine; the mutant enzyme exhibits carbapenemase activity.

We established a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method to detect various genotypes of *bla*<sub>GES</sub> and another LAMP method to discriminate carbapenemase genotypes of *bla*<sub>GES</sub>. Two primer sets targeting *bla*<sub>GES</sub> (GES-LAMP) and the point mutation (Carba-GES-LAMP) were designed and evaluated for specificity and sensitivity. The detection limit of the GES-LAMP method was assessed using purified DNA and DNA-spiked clinical samples (urine, sputum, and blood). To determine the clinical usefulness of the methods, we used different (genotypically and phenotypically) *P. aeruginosa* clinical isolates, collected from diverse geographical locations between 2003 and 2012<sup>1)</sup>.

The novel LAMP assay targeting *bla*<sub>GES</sub> was highly specific. The detection limit was 10 DNA copies per reaction; the assay was 10-fold more sensitive than conventional PCR. The LAMP assay detected *bla*<sub>GES</sub> with high sensitivity in all DNA-spiked samples; PCR did not detect *bla*<sub>GES</sub> in blood samples. The GES-LAMP method correctly detected the isolates containing *bla*<sub>GES</sub>, and our Carba-GES-LAMP method of detecting point mutations correctly identified the *bla*<sub>GES</sub> positive organisms with carbapenemase activity.

This is the first report of the GES  $\beta$ -lactamase gene detection assay using the LAMP method. Our new assays effectively detect *bla*<sub>GES</sub> and critical unique mutations. In this presentation, we also describe a new LAMP method detecting other  $\beta$ -lactamase genes including *bla*<sub>NDM-1</sub> and *bla*<sub>KPC</sub> etc.

Contributors: Kim DW, Hanyang Univ., Korea; Gardner H, Evelo biosciences, USA; Kilgore PE, Wayne State Univ., USA

Reference: 1) Kos VN, et. al. The Resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in Relationship to Phenotypic Susceptibility. Antimicrob. Agents Chemother. 59 (1): 427-436, 2015.

# 流入下水由来 *Escherichia coli* における *mcr-1* 遺伝子の出現と家禽病原性大腸菌 (APEC) 関連病原遺伝子の共保有

○ 林航<sup>1</sup>, 田中隼斗<sup>2</sup>, 飯村将樹<sup>2</sup>, 曾我英司<sup>2</sup>, 久保亮一<sup>3</sup>,  
川村久美子<sup>4</sup>, 長野由紀子<sup>4</sup>, 荒川宜親<sup>4</sup>, 長野則之<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>信州大学大学院 総合医理工学研究科, <sup>2</sup>信州大学大学院 医学系研究科,  
<sup>3</sup>関東化学株式会社 試薬技術部, <sup>4</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】プラスミド性コリスチン (CL) 耐性遺伝子 *mcr* のリザーバーとして家畜の役割が注目されているが, 国内の水系環境における *mcr* の実態は未だ不明である。本報では流入下水に着目し調査を実施した結果について報告する。

【方法】長野県内の下水処理場 A~C の 3 施設の流入下水より検出された CL 耐性 *Escherichia coli* 全 7 株 (Ec1~Ec7) を対象に, NGS 解析を含めた遺伝学的解析により CL 耐性機序及び耐性株の特性の解明を試みた。

【結果と考察】CL 耐性 *E. coli* は A 施設で Ec1, Ec2 の 2 株, B 施設で Ec3, Ec4 の 2 株, C 施設で Ec5, Ec6, Ec7 の 3 株が検出された。7 株に対する CL の MIC は 4-16 µg/mL であり, 全株でプラスミド性 CL 耐性遺伝子 *mcr-1* が認められたが, ESBL 非産生性でほとんどの抗菌薬に感性であったことが特徴的であった。Ec1~Ec7 はそれぞれ B2-O25:H4-ST131-*fimH22*, A-O16:H5-ST871-*fimH25*, B1-O8:H9-ST767-*fimH32*, A-O81:H27-ST10-*fimH54*, B2-O2:H1-ST135-*fimH2*, F-O11:H6-ST457-*fimH145*, B1-O23:H16-ST453-*fimH31* と異なる遺伝系統に属していた。さらに Ec1, Ec5, Ec6, Ec7 は腸管外病原性大腸菌 (Extraintestinal Pathogenic *E. coli*) and/or 尿路病原性大腸菌 (Uropathogenic *E. coli*) に分類された。*mcr-1* は 5 株 (Ec1, Ec2, Ec3, Ec4, Ec7) で IncX4 プラスミド上に, 2 株 (Ec5, Ec6) で IncI2 プラスミド上に担われていた。IncX4 プラスミド pEc1, pEc2, pEc4, pEc7 の総塩基配列長は 33,309 bp であり, 高い配列類似性が認められた。pEc3 の総塩基配列長は 33,309 bp であった。一方, IncI2 プラスミド pEc5, pEc6 の総塩基配列長はそれぞれ 60,710 bp, 60,733 bp であった。これらの *mcr-1* 保有プラスミドの全塩基配列は, 国内や中国をはじめとする海外で検出されたヒト臨床材料及び家畜由来 CL 耐性 *E. coli* が保有する IncX4 及び IncI2 プラスミドの全塩基配列と完全一致又は高い相同性を示していた。

CL 耐性 *E. coli* 7 株中 5 株がコリスチンやヘモリジン等を含む家禽病原性大腸菌 (Avian pathogenic *E. coli*) や新生児髄膜炎起因大腸菌 (neonatal meningitis *E. coli*) 関連の病原因子遺伝子を保有していた。これらの病原遺伝子は B2-O25:H4-ST131-*fimH22* に属する Ec1 では染色体上に存在していたが, 4 株 (Ec3, Ec5, Ec6, Ec7) では IncF type の ColV プラスミド上に担われていたことが注目された。さらに Ec3 は ColV プラスミドに加えて, コリスチン B/M 関連遺伝子が存在する IncI1 type の ColBM プラスミド (84,497 bp) も同時に保有していた。

これまで国内ではヒト, 家畜, 食肉から *mcr* が検出されてきている。本研究の知見で *mcr-1* 保有株が下水環境に存在することが確認され, さらにその多くが APEC 関連病原遺伝子を同時保有することが初めて明らかとなった。IncX4 及び IncI2 プラスミドは *mcr* の世界的な拡散に関与しており, 市中における薬剤耐性菌の拡散リスクの観点から新たな *mcr-1* のリザーバーとして水系環境の重要性を認識する必要がある。本研究の内容は Hayashi W. et al., Appl Environ Microbiol, vol 85, issue 22, 2019 に掲載されている。

## コリスチン耐性の付与が及ぼす大腸菌の病原性変化

○佐藤豊孝<sup>1</sup>、山本聡<sup>1</sup>、小笠原徳子<sup>1</sup>、臼井優<sup>2</sup>、鈴木仁人<sup>3</sup>、林航<sup>4</sup>、長野則之<sup>4</sup>、土井洋平<sup>5,6</sup>、田村豊<sup>7</sup>、高橋聡<sup>8,9</sup>、横田伸一<sup>1</sup>

1, 札幌医科大学・医学部・微生物学; 2, 酪農学園大学・獣医学群・食品衛生学; 3, 国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター; 4, 信州大学大学・院総合理工学研究科・医学系専攻; 5, ピッツバーグ大学医学部・感染症内科; 6, 藤田医科大学・微生物学・感染症科; 7, 酪農学園大学・動物薬教育研究センター; 8, 札幌医科大学附属病院・検査部; 9, 札幌医科大学・医学部・感染制御・臨床検査医学

コリスチンは多剤耐性グラム陰性菌感染症への最終選択薬と位置づけられている。コリスチン耐性の付与と伝達が問題となるプラスミド性耐性遺伝子(*mcr*)は腸内細菌科細菌での報告が多く、特に畜産領域から分離された大腸菌においてその保有率の高いことが知られている。一方で我々の調査では、人の臨床現場から分離されるコリスチン耐性大腸菌は1%未満であり、その多くは染色体性の *pmrAB* 遺伝子の変異に起因することを明らかにしている。

コリスチン耐性菌における人への健康危害を評価する際には、コリスチン耐性機構の付与による菌の病原性変化を正しく評価することが重要である。我々は、国内で分離された *mcr* 保有プラスミド (*IncI2\_mcr-1*, *IncX4\_mcr-1*, *IncP1\_mcr-3*, *IncFII\_mcr-5*) および *pmrAB* に認められた遺伝子変異を international high-risk clone で多剤耐性化が進行している大腸菌 O25b:H4-ST131 の臨床分離株に導入したコリスチン耐性変異株を作製し、これら変異株のマウス全身感染モデル(腹腔内感染)の病原性、定着性、コリスチンの治療効果を評価した。その結果、一部のプラスミド性コリスチン耐性機構 (*IncI2\_mcr-1*, *IncX4\_mcr-1*, *IncP1\_mcr-3*) の獲得は病原性および宿主への定着性の低下をもたらすことが示唆された。一方で、染色体性コリスチン耐性の獲得(特に *pmrB* 変異)は、感染宿主における病原性・定着性が維持され、コリスチン治療効果の減弱をもたらすことが明らかとなった。大腸菌でのコリスチン耐性の付与による人への健康危害を考えた場合、染色体性遺伝子(*pmrB*)の変異の方が、*mcr* 保有プラスミドの獲得よりも、病原性の保持、コリスチンの治療効果の低さが想定され、リスクがより高いであろうと考えられた。

## 既知の耐性機構を回避する新規アミノ配糖体系抗菌薬の探索と創製

○鈴木 仁人<sup>1</sup>、横山 武司<sup>2</sup>、五十嵐 雅之<sup>3</sup>、高橋 良昭<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター

<sup>2</sup> 東北大学大学院生命科学研究科 応用生命分子解析分野

<sup>3</sup> 公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 第2 生物活性研究部

<sup>4</sup> 公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 創薬化学研究部

2000 年代に急速に世界に拡散した超多剤耐性グラム陰性菌には、臨床で汎用されているカルバペナム系、アミノ配糖体系、フルオロキノロン系を含めて有効な抗菌薬がほとんど存在しない。本研究では、超多剤耐性グラム陰性菌にも有効な新規抗菌化合物を探索・創製することを企図した。カナマイシン型のアミノ配糖体系抗菌薬は細菌の 70S リボソームを構成する 16S リボソーム RNA (16S rRNA) の helix 44 (H44) に結合し、mRNA の翻訳を阻害することで抗菌作用を発揮する。ArmA や RmtB などの 16S rRNA メチル化転位酵素は、16S rRNA の N7-G1405 位にメチル基 (m7G1405) を修飾し、高度アミノ配糖体耐性に寄与する。本研究では、天然物ライブラリーから 16S rRNA の m7G1405 修飾に影響を受けないアミノ配糖体の新規骨格を見出し、その誘導体を 20 品目合成した。そのうち、新規誘導体 effmekacin は、*in vitro* で最も抗菌活性が優れており、多剤耐性肺炎桿菌株 (*bla*<sub>NDM-1</sub> および *rmtB* 陽性株) を経鼻感染させたマウスにおいて肺当たりの菌数を優位に減少させた。BLI 法による分子間相互作用解析において effmekacin は 16S rRNA の H44 に従来のアミノ配糖体と同程度かそれ以上の強度で結合していることが示唆された。Effmekacin は、従来のアミノ配糖体が作用できなかった高度アミノ配糖体耐性の 16S rRNA メチル化転位酵素産生菌も標的に加えられることから、従来のアミノ配糖体の弱点・特性を克服・改良した次世代型誘導体として期待できる。現在、クライオ電顕を用いて effmekacin と 70S リボソームの複合体の解析を進めている。

薬剤耐性遺伝子は潜在性ファージを介して拡散する

○和知野純一、金万春、木村幸司、荒川宜親  
名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学

#### 【緒言】

薬剤耐性遺伝子の伝播・拡散に伴う病原細菌の薬剤耐性化が大きな問題となっている。病原細菌における薬剤耐性遺伝子の伝播・拡散には、接合や形質転換といった細菌固有の DNA 伝達機構が関与している。しかし、これら DNA 伝達機構のみで、現在の薬剤耐性遺伝子の拡散状況を説明することは難しい。近年では、Outer membrane vesicle(以下 OMV)などの細胞外構造物が DNA の輸送に関与しているとの報告もある。そこで本研究では、染色体ゲノム DNA 上に種々の薬剤耐性遺伝子を有する臨床分離 *Acinetobacter baumannii* をモデルに、薬剤耐性遺伝子がどのような分子機構を介して他の細菌に伝播してゆくのかを検証した。

#### 【方法】

臨床分離 *A.baumannii* NU-60 株 (以下 NU-60 株) のゲノム配列を決定し、本菌株が有する薬剤耐性遺伝子を特定した。NU-60 株の液体培養ろ液から、OMV などの細胞外構造物を超遠心により回収した。さらに、密度勾配遠心や各種カラムにより、分画・精製を行なった。細胞外構造物の観察には電子顕微鏡を用いた。薬剤耐性遺伝子の導入実験には *A.baumannii* ATCC 17978 株を受容菌として用いた。*A.baumannii* の遺伝子組換え実験は、既報に準じた。

#### 【結果と考察】

NU-60 株のゲノム長は 4Mb ほどであり、*armA* (アミノグリコシド耐性)、*bla*<sub>TEM-1</sub> ( $\beta$ -ラクタム耐性)、*tetB*(テトラサイクリン耐性)などの薬剤耐性遺伝子を保有していた。NU-60 株の培養液から菌体を除去した後、ろ過液を超遠心にかけることで、細胞外構造物を回収した。回収したサンプルを電子顕微鏡で観察すると、OMV や phage 様の構造物が確認された。そして、これら構造物を含むサンプルを *A.baumannii* ATCC 17978 株 (以下、受容菌) に添加、一定時間培養後回収し、抗菌薬入りの寒天培地に塗布することで、薬剤耐性を獲得した派生体を選択することができた。アミノグリコシド含有培地で選択した派生体は NU-60 株由来の *armA* 遺伝子を保有していた。テトラサイクリン含有培地で選択した派生体は *tetB* 遺伝子を、カルベニシリン含有培地で選択した派生体は *bla*<sub>TEM-1</sub> 遺伝子をそれぞれ保有していた。これら派生体のゲノム解析を行なった結果、派生体には、NU-60 株由来の薬剤耐性遺伝子を含む 30kb 程度の DNA 断片が、homologous recombination により取り込まれていたことが明らかとなった。これら一連の実験により、NU-60 株の培養ろ過液中に存在する薬剤耐性遺伝子含有 DNA 断片を、受容菌が獲得することで、新たな薬剤耐性株が出現することを確認した。

NU-60 株の培養ろ過液には多量の DNA が含まれており、これらの大部分は DNase により容易に消化された。しかし、ごく少量ではあるが、DNase 処理後に残存する DNA 断片もあり、これらは OMV やファージ中に内包された DNA と予測された。上述した薬剤耐性遺伝子の転移現象は、回収した細胞外構造物を DNase 処理し、サンプルとして供した場合にも確認された。これらの知見に基づき、発表者らは、OMV やファージに内包された薬剤耐性遺伝子が受容菌に取り込まれることで、薬剤耐性株が出現したとの仮説を立て、さらに検証を進めた。OMV を TritonX-100 で破壊し、DNase 処理を行なった後のサンプルを供した場合においても薬剤耐性遺伝子の転移現象は確認された。したがって、本実験系において、薬剤耐性遺伝子転移現象への OMV の関与は否定的なものとなった。一方、薬剤耐性遺伝子の転移現象に資する成分について分画・精製を進めた結果、ファージの構成成分と考えられるカプシド蛋白が特定された。当該カプシド遺伝子を欠損させると、薬剤耐性遺伝子の転移現象は生じなくなった。

上述の結果をまとめると、本実験により、薬剤耐性遺伝子を含む DNA 断片を内包したファージが NU-60 株から放出され、それが受容菌に感染、その後、相同組換えにより受容菌のゲノム上に薬剤耐性遺伝子が挿入されるという一連の薬剤耐性遺伝子伝播様式が明らかとなった。これは、ファージを介した一般形質導入による薬剤耐性遺伝子の伝播機構の存在を示したものと言える。

## *Mycoplasma pneumoniae* のクラリスロマイシン耐性遺伝子の検出状況

○ 小川美保、坂田竜二、市村禎宏、古畑健司  
株式会社ビー・エム・エル 細菌検査課

【目的】 *Mycoplasma pneumoniae* は非定型肺炎気炎菌の中でも頻度が高く、時に重症化や蔓延化するケースもあることから、適切な治療を迅速に行うことが要求される。また、非定型肺炎起炎菌に共通した臨床的特徴として、β-ラクタム系抗菌薬が無効であるため *M. pneumoniae* の感染を特定することは臨床診断において重要な意義がある。今回我々は、ジーンキューブを用いてマイコプラズマのマクロライド耐性遺伝子を調査したので報告する。

【材料および方法】 2019年4月から6月までの間にマイコプラズマ/LAMP法で陽性になったDNA抽出液(QIAcube)59検体、陽性になった保存検体(24時間冷蔵保存)109検体の計168検体を、ジーンキューブマイコプラズマ・ニューモニエを用いて測定した。また、2019年7月から8月までの間に提出された234検体について、LAMP法と同時にアッセイを行った。

マクロライド耐性遺伝子変異については、マクロライド薬剤耐性に関与する、23S rRNA遺伝子の2063番目または2064番目の塩基を標的としている。

【結果】マイコプラズマ/LAMP法で陽性になったDNA抽出液59検体および保存検体109検体の計168検体はジーンキューブマイコプラズマ・ニューモニエで測定した結果、すべて陽性と判定された。また、マクロライド薬剤耐性遺伝子変異は50検体(29.8%)で認められた。LAMP法と同時にアッセイを行った234検体について、陰性、陽性ともすべて結果は一致した。陽性は34検体(14.5%)、そのうちマクロライド薬剤耐性遺伝子変異が認められたのは9検体(26.5%)であった。

全ての陽性検体の合計は202検体で、そのうちマクロライド薬剤耐性遺伝子変異が認められたのは59検体(29.2%)であった。そのうち成人は10人(5.9%)であり、年齢は20から46才であった。

【考察】本邦でのマクロライド系抗菌薬の使用量が増加した2000年以降に、耐性マイコプラズマが報告されてきており、また、成人(20歳以上)においても、2008年から2011年にかけて、マクロライド耐性率が約10%から約35%と年々増加してきていると報告されている。今回の調査ではマクロライド薬剤耐性遺伝子変異は26.5%であり、成人の割合は5.9%と報告されているデータより低めであったが、今後の動向に注意をしていく必要があると考えられた。

耐性結核患者生体内における結核菌の耐性 population 変動の観察

吉田志緒美<sup>1</sup>、岩本朋忠<sup>2</sup>、有川健太郎<sup>2</sup>、関塚剛史<sup>3</sup>、黒田誠<sup>3</sup>、御手洗聡<sup>4</sup>、露口一成<sup>1</sup>、井上義一<sup>1</sup>、鈴木克洋<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NHO 近畿中央呼吸器センター

<sup>2</sup>神戸市環境保健研究所

<sup>3</sup>国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター

<sup>4</sup>公益財団法人結核予防会 結核研究所

【背景】結核の多剤併用療法は(1)各薬剤に対する結核菌の耐性は一定の確率で起こる突然変異と、(2)耐性となる確率は系統の異なる薬剤間では独立する、という根拠を基に有用とされている。通常、耐性結核の場合、その薬剤に対する耐性度 (MIC) は耐性薬剤を使用しない限り上昇しない。今回われわれは、RFP を除く化学療法下において RFP 耐性結核患者由来の分離株の RFP の MIC 値が変動する耐性結核症例を経験したため、分離菌株の耐性遺伝子の確認と治療経過との相関を検討した。【症例】50 歳代、男性。前医にて MDR-TB と判明し、当院紹介となる。RFP を除く化学療法 (INH,EMB,LVFX,PAS,KAN) により、いったん排菌停止となったが、自己中断を繰り返し、症状悪化のため 6 回目の治療入院となった。【方法】6 回目の治療期間中に得られた複数の分離株から MIC 値を測定した。MiSeq を用いてゲノム配列を取得し、菌株内の耐性遺伝子変異の割合と服薬状況を比較した。【結果】入院 1 日目と 54 日目の RFP 感受性株(MIC 0.03mg/L)の耐性遺伝子の割合は *rpoB* 変異 (V170L)が優勢であったが、61 日目及び 89 日目の RFP 耐性株(MIC 8mg/L)は V170F が優位となった。前者の V176L 変異 2 株が LVFX に対して感受性 (MIC 0.25mg/L) であったのに対し、後者の V176F 変異 2 株は *gyrA* 変異 (S91P) を有する LVFX 耐性 (MIC 2mg/L)であった。また、RFP の High-probability compensatory mutation として知られている *rpoC* V483A 変異の割合が上昇した (13→59%)。同患者は 38 から 58 日目の期間に自己中断が確認されており、71 日目にレジメンの変更がなされていた (EMB,CS,TH,LZD,DLM)。これら 4 株間のゲノム比較から、複数株による重複感染は否定され、単一株内のサブポピュレーションの変化による現象であることが確認された。

【考察】本症例は LVFX 服薬の有無により RFP、LVFX 耐性度の異なる株が優勢となり、治療は難渋した。また、本現象は、キノロンと RFP 間における耐性遺伝子変異の相互作用が関係している可能性が考えられ、耐性結核の治療の繰り返しによる生体内での感受性菌と耐性菌の構成比率の揺らぎが、治療奏効に影響する事例と考えられた。通常の検査ではこれらの現象をとらえることは難しく、ゲノム解析により菌の生体内での挙動が明らかとなった貴重な報告といえる。

## AmpC 変異によるセフィデロコール低感受性化機構の検討

河合聡人<sup>1</sup>、Ryan K. Shields<sup>2</sup>、Christi L. McElheny<sup>2</sup>、土井洋平<sup>1,2</sup>

1 藤田医科大学医学部微生物学講座

2 ピッツバーグ大学医学部感染症内科

新規セファロスポリンであるセフィデロコールへの多剤耐性グラム陰性桿菌の耐性機構についてはこれまで報告がない。我々のグループはセフィデロコールの MIC が >16 mg/L を示した臨床分離 *Enterobacter cloacae* Ent385 株の耐性機序を検討した。

まず大腸菌を利用した機能ゲノムクローニングによりセフィデロコール耐性遺伝子を検索した。その結果、Ent385 株由来の染色体性 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子 *ampC* を組み入れた大腸菌株のセフィデロコール MIC が 2 mg/L に上昇していた。これは宿主株の 64 倍であり、AmpC によりセフィデロコールが加水分解されている可能性が示唆された。この AmpC では R2 ループに位置する 294-295 位のアラニンとプロリンが欠失しており、296 位のロイシンがバリンに置換されていた。この 2 アミノ酸欠失の復帰変異株を作成するとセフィデロコールの MIC は 0.06 mg/L に低下したことから、この欠失がセフィデロコール耐性に直接関連していることが示された。

次に AmpC<sup>Ent385</sup> アポ結晶の構造を 1.40 Å、AmpC<sup>Ent385</sup>-セフトジジム共結晶の構造を 1.65 Å 分解能で決定した。両構造を重ねた時の r.m.s.d.値は 0.16 Å で全体構造は類似していることを示した。しかし、AmpC<sup>Ent385</sup> にみられる 2 残基欠失により H-9 ヘリックス、H-10 ヘリックスおよび R2 ループの構造には大きな変化が見られた。特に H-10 ヘリックスが消失することで、基質結合部位がバルクの溶媒領域に達し、R2 側鎖の認識が容易になっていることが考えられた。また、分光吸光度計による酵素活性の測定により、AmpC<sup>Ent385</sup> によりセフィデロコールが加水分解されていることも確認した。

さらに、我々が以前に報告したプラスミド性の基質特異性拡張型 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ(ESAC)である CMY-33 (293 - 294 位が欠失)、CMY-44 (293 - 296 位が欠失) を大腸菌で発現しセフィデロコールへの感受性を調べたところ、MIC は共に 1 mg/L で、アミノ酸欠失のない CMY-2 に比べ 8 倍上昇していた。AmpC 産生菌による感染症の治療にセフィデロコールが用いられると、このような ESAC 産生株がセフィデロコール耐性菌として選択される可能性がある。

# ヒト臨床由来 *Enterococcus faecalis* ST634 に認められたリネゾリド耐性遺伝子

## *optrA* 保有新奇プラスミド

飯村将樹<sup>1</sup>, 林航<sup>2</sup>, 新井恵理子<sup>3</sup>, 名取達矢<sup>3</sup>, 堀内一樹<sup>3</sup>, 松本剛<sup>3</sup>, 田中隼斗<sup>1</sup>,  
曾我英司<sup>1</sup>, 長野由紀子<sup>4</sup>, 荒川宜親<sup>4</sup>, 長野則之<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科,<sup>2</sup>信州大学大学院 総合医理工学研究科,

<sup>3</sup>信州大学医学部附属病院 臨床検査部,<sup>4</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】オキサゾリジノン系抗菌薬のリネゾリド(LZD)はMRSA やVRE に起因するヒト感染症の重要な治療抗菌薬である。国内のMRSA 及び *Enterococcus spp.* ヒト臨床由来株はLZD に対し高い感性率を示している。本報ではLZD 耐性遺伝子 *optrA* 保有 *Enterococcus faecalis* ST634 の解析知見を報告する。

【材料と方法】70 歳代男性の胆汁由来 LZD 耐性 (MIC 8  $\mu$ g/mL) *E. faecalis* の耐性機序及び遺伝的特性の解明を目的に WGS 解析を行った。

【結果と考察】本菌はペニシリン系薬, グリコペプチド系薬, キノロン系薬に感性を示したのに対して, クロラムフェニコール(CP), エリスロマイシン, ミノサイクリンに耐性であった。LZD 耐性の主要な機序である 23S rRNA の domain V 領域のアミノ酸置換, 及び 50S subunit protein L3, L4, L22 のアミノ酸置換は確認されなかった。しかしながら, repA\_N family に属するフェロモン反応性プラスミド pS7316*optrA* 上 (総塩基配列長 68,368 bp) に *optrA* が見出され, その上流には CP/フロルフェニコール(FP)耐性遺伝子 *fexA* が認められた。また, テトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(L)*, *tet(M)* が存在する Tn6247-like 及び接合伝達に關与する *pcfDEFG* を含む 22,430 bp 領域は中国の牛ミルク由来 *E. faecalis* の保有するプラスミドの相応配列と 99.4% の高い相同性を示した。さらに 15,810 bp の *pcfDEFG* 領域及び *optrA*, *fexA*, マクロライド耐性遺伝子 *erm(B)* が存在する Tn551 を含む 18,713 bp 領域は米国の家畜由来 *E. faecalis* の保有する pN60443F-1 及び pN60443F-2 の相応配列と各々 99% の高い相同性を有していた。しかしながら, これらの領域を同時に保有し, *optrA* に加え複数の薬剤耐性遺伝子を包含する pS7316*optrA* 全長の塩基配列と類似性を示す既報のプラスミドが確認されないことから新奇プラスミドであることが注目される。*E. faecalis* の染色体上には感染性心内膜炎/biofilm 関連線毛をコードする *ebpR-ebpABC* オペロンや endocarditis-associated antigen A をコードする *efaAfs*, 抗貪食作用に關与する *elrR-elrABCDE* オペロンや *tpx* が確認された。さらに定着に關わるコラーゲン結合蛋白をコードする *ace*, 組織の破壊侵入に關わるヒアルロニダーゼ産生遺伝子 *hylA*, *hylB*, バイオフィルム形成に關与する *srtA*, *fsrABC* オペロン, ゼラチナーゼとセリンプロテアーゼをコードする *gelE-sprE* オペロンなど感染の成立に關与する病原遺伝子が多数確認された。

pS7316*optrA* は LZD と FP に対する交差耐性を付与する耐性遺伝子 *optrA* をはじめ家畜で多用される複数抗菌薬の耐性遺伝子を同時に保有しており, 畜産環境で出現した可能性が強く示唆される。ヒト臨床由来株でこのような新奇プラスミドが確認されたことは, ワンヘルスの観点から家畜に対する抗菌薬の慎重使用が望まれる。

国内医療機関より分離された VanA 型と VanM 型の 2 つのバンコマイシン耐性遺伝子群を保有する腸球菌の新規線状プラスミドに関する分子生物学的研究

橋本 佑輔<sup>1</sup>、野村 隆浩<sup>1</sup>、平川 秀忠<sup>1</sup>、玉井 清子<sup>2</sup>、谷本 弘一<sup>3</sup>、富田 治芳<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>群馬大 院医 細菌学、<sup>2</sup>株式会社ミロクメディカルラボラトリー、<sup>3</sup>群馬大 院医 薬剤耐性菌実験施設

【緒言】

腸球菌間におけるプラスミドの水平伝播は、バンコマイシン(VAN)耐性遺伝子群の拡散に重要な役割を果たしている。VAN 耐性のうち临床上問題になるものの多くが VanA 型と VanB 型である。これらに加え、近年中国では VAN に対して高度耐性を示す VanM 型 VRE が増加傾向であると報告されており、VanM 型耐性遺伝子群を保有した環状プラスミドの関与が示唆されている。現在までに知られている腸球菌のプラスミドは全て環状であり、線状プラスミドは、*Streptomyces* spp., *Borrelia* spp.等の限られた菌種でしか報告はない。

【対象・方法】

新規に考案した VRE 型決定の為の Multiplex PCR の検証過程において、VanA 型並びに VanM 型 VAN 耐性遺伝子群の両者を保有する *Enterococcus faecium* (AA708 株)を国内臨床分離株から発見した。この株は VAN MIC 値 256mg/L を示す高度耐性株であった。次世代シーケンス解析の結果、VanA 型並びに VanM 型 VAN 耐性遺伝子群は、約 143kb のプラスミド上に存在することが確認され、このプラスミドは片側がヘアピン構造を形成する線状プラスミドであると考えられた。PFGE 解析から、このプラスミドの他端には蛋白が結合していることが推測された。接合伝達実験により、臨床にて起炎菌となることの多い *E. faecalis*, *E. faecium* に加え、*E. hirae*, *E. casseliflavus* への伝達性も確認され、これら接合伝達株内でも線状構造をとることが確認された。

【考察】

腸球菌における初の線状プラスミドを国内臨床分離株より発見した。線状プラスミドは、(1) *Streptomyces* spp.等が保有する 5'末端に蛋白が結合した Invertron 型、(2) *Borrelia* spp.等が保有する Hairpin 型の 2 つに大別されているが、この線状プラスミドは両端の構造が異なる Hybrid 型と推測され、構造的にみて極めて新規性の高い線状プラスミドと考えられた。更に VanA/VanM 型という 2 つの耐性遺伝子群を保有し、接合伝達能も有することから臨床的重要性があると考えられた。

