



第51回  
薬剤耐性菌研究会  
プログラム・抄録集

2022年11月11日(金)・12日(土)  
群馬県安中市 磯部ガーデン

# 第51回薬剤耐性菌研究会

会 期：2022年11月11日（金）13:25  
～ 11月12日（土）11:50

会 場：磯部ガーデン 4F「桜」  
〒379-0127 群馬県安中市磯部 1-12-5  
Tel 027-385-0085  
<https://www.isobesuzume.co.jp/>

会 長：菅井 基行（国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター）  
開催当番：富田 治芳（群馬大学大学院医学系研究科細菌学/  
薬剤耐性菌実験施設）

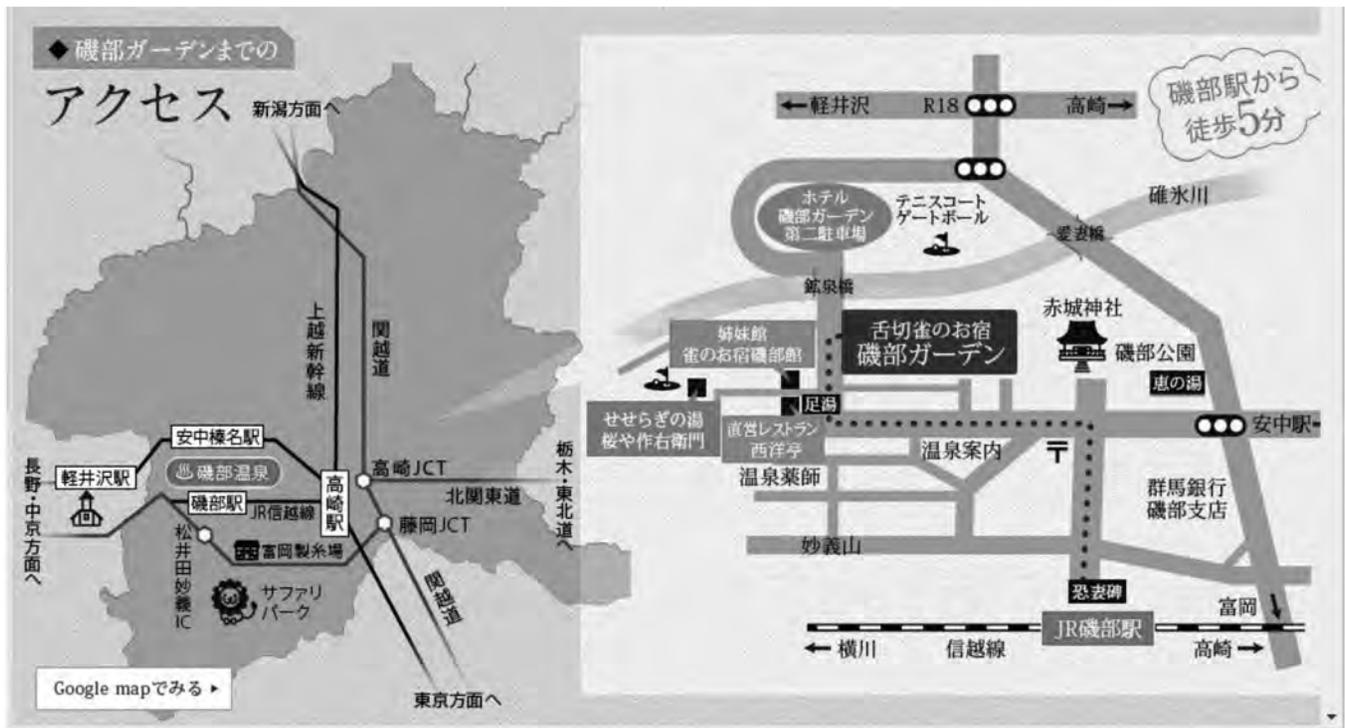
研究会事務局

連絡先：群馬大学大学院医学系研究科細菌学・薬剤耐性菌実験施設

代 表：富田 治芳

TEL: 027-220-7992 FAX: 027-220-7996

## 会場までのアクセス



### お車：

東京方面から 練馬 IC-(関越道 60分)-藤岡 JCT-(上信越道 35分)-松井田妙義 IC より 10分  
 中京方面から 名古屋 IC-(中央道 130分)-岡谷 JCT-(上信越道 40分)-更埴 JCT-(上信越道 45分)-松井田妙義 IC より 10分

### 新幹線：

東京-(上越新幹線 50分)-高崎-(信越本線 18分)-磯部下車 または  
 東京-(長野新幹線 72分)-安中榛名下車-タクシー-15分  
 名古屋-(東海道新幹線 101分)-東京-(上越新幹線 50分)-高崎-(信越本線 18分)-磯部下車

- ・ 11、12日両日の磯部駅－ホテル間のシャトルバスについては、運航予定です。

# ご 案 内

## 1. 参加受付

受付は11月11日（金）12:30より4F会議室「桜」入口付近にて行います。

## 2. 宿泊／参加費

17,000円（内訳：年会費1,000円、研究会参加費6,000円、宿泊費10,000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。
- ・ 今回も事前にオンライン参加登録された方に向けてZoomでの同時配信を行います（ただし、質問の受付は会場参加者からのみです）。そのため、すべての発表は事務局で準備したPC(Windows10, PowerPoint2016)を用いて行います。発表用のデータを発表されるセッションの前の休憩時間までにUSBメモリでお持ちください。

ご自身のPCでの発表は控えていただきますようお願いいたします（どうしてもご自身のPCを使用する必要がある方は、発表順序を調整しますので必ず事前にご連絡いただきますようお願いいたします）。
- ・ 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 51 回薬剤耐性菌研究会プログラム

2022 年 11 月 11 日 (金)

13:25～16:00

13:25～13:30

開会の挨拶

一般演題：発表 12 分、討論 3 分

13:30～14:15

座長：港 雄介（藤田医科大学）

腸球菌

Enterococcal linear plasmids adapt to *Enterococcus faecium* and spread within multidrug-resistant clades.

○橋本佑輔<sup>1</sup>，鈴木仁人<sup>2</sup>，野村隆浩<sup>1</sup>，久留島潤<sup>1</sup>，平川秀忠<sup>1</sup>，谷本弘一<sup>3</sup>，  
富田治芳<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>群馬大学大学院医学系研究科細菌学、<sup>2</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター、  
<sup>3</sup>群馬大学大学院医学系研究科附属薬剤耐性菌実験施設)

国内で臨床分離された VanD 型バンコマイシン耐性 *Enterococcus faecalis* に関する分子疫学的研究

○三村健介<sup>1</sup>，橋本佑輔<sup>1</sup>，久留島潤<sup>1</sup>，平川秀忠<sup>1</sup>，野村隆浩<sup>1</sup>，谷本弘一<sup>2</sup>，  
村谷哲郎<sup>3,4</sup>，富田治芳<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>群馬大学大学院医学系研究科細菌学、<sup>2</sup>群馬大学大学院医学系研究科附属薬剤耐性菌実験施設、<sup>3</sup>ひびき AMR 研究会、<sup>4</sup>愛信会小倉到津病院)

2013 年から 2020 年における都内 2 次医療機関から分離された Linezolid 非感受性腸球菌の分子遺伝学的解析

○伊藤志昂<sup>1</sup>，野村隆浩<sup>2</sup>，谷本弘一<sup>3</sup>，金子奈緒実<sup>1</sup>，大塚昌信<sup>1</sup>，吉田美江子<sup>1</sup>，  
富田治芳<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>東邦大学医療センター大橋病院臨床検査部、<sup>2</sup>群馬大学大学院医学系研究科細菌学、<sup>3</sup>群馬大学大学院医学系研究科附属薬剤耐性菌実験施設)

14:15～15:00

座長：平川 秀忠(群馬大学)

サルモネラ/結核菌

多剤耐性 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi の分子疫学解析

○林謙吾<sup>1</sup>, 鈴木匡弘<sup>1</sup>, 渡邊剛史<sup>2</sup>, 藤田芳郎<sup>2</sup>, 土井洋平<sup>1,3,4</sup>

(<sup>1</sup>藤田医科大学医学部微生物学講座, <sup>2</sup>中部ろうさい病院リウマチ膠原病科, <sup>3</sup>藤田医科大学医学部感染症科, <sup>4</sup>ピッツバーグ大学医学部感染症科)

### 多剤耐性結核治療に関連する薬剤の MIC 耐性カテゴリーの検証

○吉田志緒美<sup>1</sup>, 青野昭男<sup>2</sup>, 高木明子<sup>2</sup>, 近松絹代<sup>2</sup>, 五十嵐ゆり子<sup>2</sup>, 露口一成<sup>1</sup>, 御手洗聡<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>国立病院機構近畿中央呼吸器センター 臨床研究センター, <sup>2</sup>公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部)

### 抗酸菌のピラジナミドに対する薬剤耐性機構の解明

○港雄介

藤田医科大学医学部 微生物学講座

～☕～☕～**coffee break 15:00～15:15**～☕～☕～

15:15～ 16:00

座長：小川 美保((株)ビー・エム・エル)

### 薬剤耐性遺伝子

#### 機械学習による大腸菌の薬剤耐性遺伝子許容要因の探索

○鈴木匡弘

藤田医科大学医学部微生物学講座

### A novel LAMP method detecting $\beta$ -lactamase genes 2

○Jun Sakai<sup>1</sup>, Takahiro Iijima<sup>2</sup>, Dai Kanamori<sup>2</sup>, Akihiro Nakamura<sup>2</sup>, Takashi Ogihara<sup>2</sup>, Tomonori Hoshino<sup>2</sup>, Shigefumi Maesaki<sup>1</sup>, and Mitsuko Seki<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Saitama Medical University, <sup>2</sup>Meikai University School of Dentistry)

### *Corynebacterium striatum* の $\beta$ -ラクタム薬耐性に寄与する新規耐性遺伝子の同定

○黒木香澄<sup>1</sup>, 久恒順三<sup>1</sup>, 宮本仁志<sup>2</sup>, 村上忍<sup>2</sup>, 栗本朋典<sup>3</sup>, 小濱邦彦<sup>4</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>愛媛大学医学部附属病院 検査部, <sup>3</sup>沖縄県立南部医療センター・こども医療センター 小児科, <sup>4</sup>独立行政法人労働者健康安全機構 中国労災病院 中央検査部)

18:30～20:30 情報交換会 3F 「竹」

2 日目

2022 年 11 月 12 日 (土)

9:30~11:45

9:30~9:45

会務報告

一般演題：発表 12 分、討論 3 分

9:45~10:30

座長：多田 達哉 (順天堂大学)

動物における薬剤耐性菌

市街地生息カラス由来 *Escherichia coli* の薬剤耐性と人獣共通感染症の潜在的病原性の評価

○坂口かなえ，瀧澤志野，伝田智宏，田邊瑞来，曾我英司，小出将太，林 航，  
長野由紀子，長野則之

(信州大学大学院 医学系研究科 総合医理工学研究科)

市街地生息カラスにおける人獣共通感染症希少病原体 *Escherichia marmotae*,  
*E. ruysiae*, *Vibrio cincinnatiensis* の出現

○瀧澤志野，曾我英司，坂口かなえ，田邊瑞来，伝田智宏，小出将太，林 航，  
長野由紀子，長野則之

(信州大学大学院 医学系研究科 総合医理工学研究科)

猫から分離された *Acinetobacter modestus* におけるコリスチン耐性因子の解析

○佐久間理史<sup>1</sup>，橋本雅仁<sup>2</sup>，霜島正浩<sup>3</sup>，切替照雄<sup>1,4</sup>，多田達哉<sup>1,4</sup>

(<sup>1</sup>順天堂大学医学部微生物学講座，<sup>2</sup>鹿児島大学理工学部，<sup>3</sup>株式会社スギヤマゲン，<sup>4</sup>順天堂大学大学院医学研究科微生物学)

～☕～☕～**coffee break 10:30~10:45**～☕～☕～

10:45～11:45

座長:小出 将太(信州大学)

コリスチン耐性/カルバペネム耐性

Potential resistance of *mcr-9*, a mobilized colistin resistance gene, in colistin-susceptible Enterobacteriaceae isolates against colistin and LL-37

○Pegah Kananizadeh, Tatsuya Tada, Satoshi Oshiro, Tomomi Hishinuma, Mari Tohya, Teruo Kirikae

(Department of Microbiology, Juntendo University School of Medicine)

*mcr-1* 保有プラスミドの付与が及ぼす大腸菌の病原性減弱メカニズムの解明

○佐藤豊孝<sup>1,2,3,4</sup>, 山本聡<sup>4</sup>, 小笠原徳子<sup>4</sup>, 臼井優<sup>5</sup>, 鈴木仁人<sup>6</sup>, 林 航<sup>7</sup>, 長野則之<sup>7</sup>, 土井洋平<sup>8,9</sup>, 田村豊<sup>10</sup>, 高橋聡<sup>11,12</sup>, 横田伸一<sup>4</sup>, 堀内基弘<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>北海道大学大学院獣医学研究院 獣医衛生学, <sup>2</sup>北海道大学大学院 国際感染症学院, <sup>3</sup>北海道大学 One Health リサーチセンター, <sup>4</sup>札幌医科大学医学部 微生物学, <sup>5</sup>酪農学園大学獣医学群 食品衛生学, <sup>6</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター, <sup>7</sup>信州大学大学院総合医理工学研究科 医学系専攻, <sup>8</sup>ピッツバーグ大学医学部 感染症内科, <sup>9</sup>藤田医科大学微生物学・感染症科, <sup>10</sup>酪農学園大学名誉教授, <sup>11</sup>札幌医科大学附属病院 検査部, <sup>12</sup>札幌医科大学医学部 感染制御・臨床検査医学)

海外入院歴を有する患者から分離された複数のカルバペネマーゼ産生菌のゲノム解析

○西田 智<sup>1</sup>, 吉野友祐<sup>1</sup>, 斧 康雄<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>帝京大学医学部微生物学講座, <sup>2</sup>帝京平成大学健康メディカル学部)

カルバペネム耐性緑膿菌臨床分離株で見出されたVIM-24メタロβラクタマーゼ遺伝子反復配列

○菱沼知美<sup>1</sup>, 多田達哉<sup>1</sup>, 遠矢真理<sup>1</sup>, 新谷政己<sup>2</sup>, 鈴木仁人<sup>3</sup>, 小川美保<sup>4</sup>, 霜島正浩<sup>4,5</sup>, 佐藤浩司<sup>1</sup>, 切替照雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>順天堂大学大学院医学研究科微生物学, <sup>2</sup>静岡大学学術院工学領域, <sup>3</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター, <sup>4</sup>株式会社ビー・エム・エル, <sup>5</sup>株式会社スギヤマゲン)

11:45～

閉会の挨拶

# 抄 録

---



## Enterococcal linear plasmids adapt to *Enterococcus faecium* and spread within multidrug-resistant clades.

○橋本 佑輔<sup>1</sup>、鈴木 仁人<sup>2</sup>、野村 隆浩<sup>1</sup>、久留島 潤<sup>1</sup>、平川 秀忠<sup>1</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>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター、<sup>3</sup>群馬大 院医 薬剤耐性菌実験施設)

### 【緒言】

プラスミドの水平伝達は腸球菌における薬剤耐性遺伝子の拡散に重要な役割を果たしている。我々は 2019 年に日本国内のバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)から線状プラスミド pELF1 を発見・報告し、次いで 2020 年に国内医療機関における pELF1 型線状プラスミドが原因となった院内アウトブレイクを報告した。現在までに腸球菌の線状プラスミドの報告は極めて少なく、その網羅的な分子疫学解析や宿主腸球菌への影響に関する報告はない。

### 【方法・方法・結果】

臨床分離腸球菌 1769 株を対象に PCR 法により pELF1 型線状プラスミドの保有状況を確認したところ、16 株(VRE 13 株、VSE 3 株)を検出した。これらは全て *Enterococcus faecium* で多剤耐性臨床分離株の系統であった。Public database 検索から得た 14 個の pELF1 型線状プラスミドの配列と共に WGS に基づくコアゲノム解析を実施したところ、pELF1 型線状プラスミドのコア遺伝子の配列・構造は極めて保たれており、一部は薬剤耐性遺伝子を含んだ mobile genetic element が挿入され多様性が生み出されていた。pELF1 型線状プラスミドを複数種の腸球菌に保有させ fitness cost について解析したところ、*E. faecium* において fitness cost が小さく、抗菌薬非存在下においても極めて安定的に保持された。Transcriptome 解析からも、pELF1 型線状プラスミドの保有は *E. faecium* 宿主への転写レベルでの影響が少なく、またプラスミド自身の遺伝子群の転写レベルも比較的 low であることが確認され、fitness cost の低減に繋がっている可能性が示唆された。

### 【考察】

腸球菌の pELF1 型線状プラスミドは日本国内のみならず、全世界に普遍的に存在しており、特に近年検出されたものの一部にはバンコマイシン耐性遺伝子群を含んだ薬剤耐性遺伝子が獲得されていた。この線状プラスミドは VRE において最多の菌種である *E. faecium* 株で最も安定的に保持され、更に高頻度接合伝達性を示すことから *E. faecium* の多剤耐性化、VRE の拡散・増加に寄与しうると考えられる。

## 国内で臨床分離された VanD 型バンコマイシン耐性 *Enterococcus faecalis* に関する分子疫学的研究

○三村健介<sup>1)</sup>、橋本佑輔<sup>1)</sup>、久留島潤<sup>1)</sup>、平川秀忠<sup>1)</sup>、野村隆浩<sup>1)</sup>、谷本弘一<sup>2)</sup>  
村谷哲郎<sup>3),4)</sup>、富田治芳<sup>1),2)</sup>

<sup>1)</sup>群馬大学大学院 医学系研究科 細菌学

<sup>2)</sup>群馬大学大学院 医学系研究科 附属薬剤耐性菌実験施設

<sup>3)</sup>ひびき AMR 研究会, <sup>4)</sup>愛信会小倉到津病院

【目的】 腸球菌属は人や動物の腸管に常在するグラム陽性球菌で約 80 種が知られている。バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は院内感染の原因となる代表的な多剤耐性菌である。各種 VRE の中でバンコマイシン (VAN) に対して高度耐性を示すものに VanD 型 VRE があるが、世界的に極めて報告が少ない。特に *Enterococcus faecalis* に関しては VanD 型 VRE の報告はほとんど無い。我々は国内で分離された VanD 型 VRE (*E. faecalis*) 5 株の分子疫学的解析を行った。

【方法・結果】 北九州市内の 3 病院から 2012~2019 年に SVR2085 (A 病院・尿)、SVR2281 (B 病院・尿)、SVR2330 (B 病院・尿)、SVR2331 (C 病院・便)、および SVR2332 (B 病院・尿) の 5 株の VanD 型 VRE (*E. faecalis*) が分離され、これらを解析した。VAN の MIC 値はそれぞれ 64 mg/L (SVR2085)、>1024 mg/L (SVR2281)、1024 mg/L (SVR2330)、>1024 mg/L (SVR2331)、1024 mg/L (SVR2332) と高度耐性を示し、また多剤耐性であった。ST 型は 4 株 (SVR2085、SVR2281、SVR2330、SVR2332) は ST392、1 株 (SVR2330) は ST4 であった。PFGE のパターンは ST 型と同様に分類された。VanD ligase のアミノ酸配列は、ST392 型の 4 株では既存の VanD<sub>5</sub> と一致していた。一方、系統樹解析より ST4 型の 1 株はこれまで報告されている VanD ligase の分類と異なり、新たに VanD<sub>7</sub> と名付けた。VanD 型 VAN 耐性遺伝子を保有する genomic island 全体の大きさは 126-185kb であり、ST392 型の 4 株の genomic island は既報と類似の構造で宿主染色体の *lysS* 内に挿入されていた。ST4 型の 1 株は既報とは異なる genomic island の構造であった。

【考察】 VanD 型 VRE (*E. faecalis*) の 1 株は他の 4 株と ST 型が異なり、VanD ligase の分類や genomic island の構造と挿入位置も異なることから別の由来と考えられた。他の 4 株は同一の起源・由来と考えられ、これら同一起源を持つ VanD 型 VRE (*E. faecalis*) が北九州市内に伝播・拡散している可能性がある。

## 2013年から2020年における都内2次医療機関から分離された Linezolid 非感受性腸球菌の分子遺伝学的解析

伊藤志昂<sup>1)</sup>、野村隆浩<sup>2)</sup>、谷本弘一<sup>3)</sup>、金子奈緒実<sup>1)</sup>、大塚昌信<sup>1)</sup>、吉田美江子<sup>1)</sup>、富田治芳<sup>2)3)</sup>

1) 東邦大学医療センター大橋病院 臨床検査部

2) 群馬大学大学院医学系研究科細菌学

3) 群馬大学医学系研究科附属薬剤耐性菌実験施設

### 【はじめに】

Linezolid (LZD)はグラム陽性菌感染症治療の最後の砦とされる抗菌薬の1つであり、MRSAやVREなどのグラム陽性菌に対してのみ有効な静菌的作用を有するoxazolidinone系の抗菌薬である。本研究では都内2次医療機関にて分離されたLZD non-susceptibility enterococci (LNSE)の耐性メカニズムと分子遺伝学的関連性について検討を行った。

### 【方法】

2013年1月1日から2020年12月31日までに、微生物検査室に提出された検体から腸球菌が分離され、薬剤感受性検査が施行された患者を対象とした。分離されたLNSE (MIC  $\geq$ 4mg/L)に対し、MLST、PFGE、oxazolidinone耐性機構解析、接合伝達実験等を行った。

### 【結果】

各種臨床検体から分離され、薬剤感受性を実施した腸球菌2,191株のうち4株(0.002%)がLNSEで、*Enterococcus faecium* 1株、*Enterococcus faecalis* 3株であった。LNSE4株は、*E. faecium*1株で23S rRNA遺伝子 domainV領域にA2504T変異、*E. faecalis*1株で23S rRNA遺伝子 domainV領域にG2576T変異がそれぞれ存在した。他の*E. faecalis*2株は*optrA*保有株であったが、*cfp*保有株、*poxTA*保有株は認めなかった。LZD耐性の伝達実験を行なったところ*optrA*保有の1株で液体培地中での伝達性が確認され、この株においては*optrA*がフェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド上に存在する可能性が示された。

### 【考察】

本研究結果から、国内で初めて高頻度接合伝達性を示す*optrA*保有*E. faecalis*が検出されたことは、LZD使用による選択圧下においては耐性遺伝子が腸球菌に急速に拡散されるリスクがあることを示唆している。今後も医療機関や市中におけるLNSEの耐性メカニズム及び拡散状況について継続して調査して行く必要がある。

## 多剤耐性 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi の分子疫学解析

○林謙吾<sup>1</sup>、鈴木匡弘<sup>1</sup>、渡邊剛史<sup>2</sup>、藤田芳郎<sup>2</sup>、土井洋平<sup>1,3,4</sup>

1. 藤田医科大学 医学部 微生物学講座
2. 中部ろうさい病院 リウマチ膠原病科
3. 藤田医科大学 医学部 感染症科
4. ピッツバーグ大学 医学部 感染症科

### 【導入】

腸チフスは *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*)による全身感染症である。腸チフスは世界的な問題であり、毎年一千万以上の症例、十万人以上の死者を出している。近年では多剤耐性腸チフス (Extensively Drug-resistant [XDR] Typhoid fever)の増加が東南アジアや中東、サハラ以南アフリカを中心に問題となっており、特にパキスタン、シンド州のカラチやハイデラバードでのアウトブレイクは問題視されている。これら多剤耐性腸チフスのパキスタンからの持ち込み症例はイギリス、カナダ、スペイン、オーストラリア、デンマーク、アメリカなどからも報告があるが、日本での報告例は少ない。今回我々は多剤耐性腸チフスの輸入症例を解析する機会を得たのでそれを報告する。

### 【症例】

26歳男性（パキスタン人と日本人のハーフ）、南アフリカ在住。パキスタン、シンド州にてハイデラバードに滞在した後カラチに移動し、親戚の結婚式に参加。その後来日し、数日してから発熱が出現し2週間持続したため中部ろうさい病院を受診。セフトレンピボキシルの先行投与あり。入院時に採取した血液培養と便培養から本菌が検出された。7日以上発熱が持続したが、メロペネムにて解熱、完治した。

### 【方法】

薬剤感受性試験は中部ろうさい病院および外注検査にて実施。藤田医科大学では NextSeq、MinION によるゲノムシーケンシング、Sequence Type および薬剤耐性遺伝子など分子疫学解析、プラスミド解析、系統樹解析を実施した。

### 【結果】

薬剤感受性試験の結果、アンピシリン、ST合剤、クロラムフェニコール、キノロン系、セファロsporin系薬剤に耐性が確認されたため XDR と判定した。耐性遺伝子は CTX-M-15、aph(3'')-Ib、sul1、qnrS1 等その他様々保有しており、これらの遺伝子の多くは IncY プラスミドにコードされていることがわかった。またこの菌株およびプラスミドは、パキスタンで流行しているクローンと一致した。

### 【考察】

各解析の結果、本菌株はパキスタンからの輸入症例であると考えられた。日本での腸チフス症例は年間約30～60例（2018年）と少なく、またその約90%は輸入症例であることを鑑みると、日本で検出された場合は薬剤耐性菌である可能性も十分考慮して治療する必要があると考えられた。

## 多剤耐性結核治療に関連する薬剤の MIC 耐性カテゴリーの検証

吉田志緒美<sup>1)</sup>，青野昭男<sup>2)</sup>，高木明子<sup>2)</sup>，近松絹代<sup>2)</sup>，五十嵐ゆり子<sup>2)</sup>，露口一成<sup>1)</sup>，御手洗聡<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 国立病院機構近畿中央呼吸器センター 臨床研究センター

<sup>2)</sup> 公益財団法人結核予防会結核研究所 抗酸菌部

【背景】WHO および ATS/CDC/ERS/IDSA から多剤耐性結核 (MDR-TB) の新しい治療ガイドラインが示され、BDQ を中心として LZD や Pretomanid、MFLX 等の併用が推奨されている。本邦において MDR-TB 治療に優先される抗結核薬は LVFX、BDQ に次いで LZD とされ、EB、PZA、DLM、CS を加えた薬剤の感受性を確認することが推奨されている。しかし、これら薬剤の MIC 感受性判定基準は必ずしも明確でない。【目的】MDR-TB 株に対する各種薬剤 (MFLX、LZD、BDQ、DLM) の *in vitro* 活性を MIC プレートによる微量液体希釈法で検証し、得られた MIC 分布を BACTEC MGIT 960 を用いた比率法による耐性基準と比較することで、MIC 耐性カテゴリーを決定する。【方法】高まん延国フィリピンから分離された多剤耐性結核菌 188 株 (MDR-TB 151、XDR-TB 37) を対象とした。CLSI M24 3<sup>rd</sup> に基づき、MIC の測定範囲を設定した。耐性の基準濃度は WHO 2018 に準拠した。【結果】MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> は、MFLX で順に 0.5 と 2 mg/L、LZD で 0.5 と 0.5、BDQ で 0.125 と 0.5、DLM で 0.015 と 0.03 であった。技術的不確実性の領域または中間カテゴリーは、MFLX で 1 mg/L に設定された。MGIT 耐性率は順に 17.8%、0.5%、1.1%、0.0%、暫定 MIC 耐性率は MFLX 18.4%、LZD 8.0%、BDQ 0.5%、DLM 0.5% となり、LZD の MIC 耐性は MGIT の結果と乖離がみられた。【考察】今後、さらに耐性菌株を増やした検証を行うと同時に、MIC と治療効果および PK/PD パラメータとの相関を検討する必要がある。

# 抗酸菌のピラジナミドに対する薬剤耐性機構の解明

港雄介

藤田医科大学医学部 微生物学講座

結核の標準治療には、リファンピシン、ピラジナミド、イソニアジド、エタンブトールの四剤が用いられる。この中でピラジナミドは、結核菌パーシスターに対しても効果を示すという特徴をもつ。ピラジナミドが導入されたことで結核の治療期間は三ヶ月間短縮され、また再燃率にも低下が見られたなど、ピラジナミドは临床上重要な薬剤である。しかしピラジナミドは、作用機序や薬剤耐性機構についていまだ不明な点が多い。ピラジナミドはプロドラックであり、結核菌の有する *pncA* にコードされるピラジナミダーゼによって、菌体内で活性体ピラジン酸に変換される。このため *pncA* 変異によりピラジナミダーゼ活性が低下した株は、ピラジナミド耐性を示す。実際に臨床分離されるピラジナミド耐性結核菌の多くは *pncA* 変異株である。しかし、ピラジナミド耐性結核菌株の一割程度は *PncA* 非依存的な耐性株であり、その耐性機構はあまり明らかにされていない。そこで本研究は、トランスポゾンを用いて結核菌のピラジナミド耐性株および感受性株の網羅的同定を実施した。解析の結果、結核菌の代謝機構やシグマ因子などが、結核菌のピラジナミド感受性に影響を及ぼしていることを明らかにした。さらに非結核性抗酸菌についても解析を進めたところ、非結核性抗酸菌は結核菌と同等のピラジナミダーゼ活性を有しており、*PncA* 非依存的にピラジナミドに耐性を示していることが明らかとなった。本発表では、我々の最新の知見を紹介させて頂く。

# 機械学習による大腸菌の薬剤耐性遺伝子許容要因の探索

鈴木匡弘

藤田医科大学医学部微生物学講座

## 【緒言】

大腸菌を MLST による ST 型レベルで観察すると、薬剤耐性遺伝子をほとんど保有しない ST 型（薬剤感受性クローン）と、多くの分離株が薬剤耐性遺伝子を保有する ST 型（薬剤耐性クローン）とが存在するよう見える。薬剤耐性遺伝子の獲得はしばしばフィッティングコストと共に説明されることが多いことから、薬剤耐性獲得・許容に関与する因子が染色体上に存在すると考えられる。一方、ゲノムデータの集積が進み、大腸菌では 30,000 株以上のデータが利用可能となっており、機械学習による解析が可能なレベルに達している。そこで、実験ターゲットを絞り込みの可能性を探るため、DecisionTree による機械学習によって薬剤耐性クローンを特徴付ける遺伝子を探索することを目的とした。

## 【方法】

**探索対象とした遺伝子の決定：** 1,862 株の大腸菌 complete ゲノムデータを用い、wgMLST の locus のうち、染色体のコア領域以外に存在する locus として、5~95%の株が保有するものを選別した。さらに薬剤耐性遺伝子やそれと関連の強い IS 等を除いた、2,679 個を対象とした。

**ゲノムデータ：** 14,445 株の contig レベルゲノムデータのうち、同一 ST 型株が 20 株以上存在した 9,400 株を使用した。ResFinder によって、*bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*<sub>OXA</sub>、*aac* のいずれかが検出された菌を薬剤耐性菌としてラベルした。ST 型毎に、薬剤耐性株が 80%以上を薬剤耐性クローン、20%以下の場合感受性クローン、それ以外を混合クローンとした。ゲノムデータは 2,679 個の wgMLST locus を BLASTn 検索し、その有無によって二値化した。

**機械学習：** 薬剤耐性及び感受性クローンの各 ST 型について、30 株までを上限に感受性クローンについては感受性菌を、耐性クローンについては耐性菌をランダムに選択し、DecisionTree による機械学習を利用し両者を分ける遺伝子を探索した。

## 【結果及び考察】

45 個の locus によって感受性クローンと耐性クローンが ST 型レベルで大別された。しかし、同一 ST 型内における感受性株と耐性株を区別する locus は見つからなかった。混合クローンの多くは耐性もしくは感受性クローンのどちらかに分類された。この 45 個の locus に薬剤耐性獲得・許容に関連する遺伝子が含まれる可能性がある。その一方この 45 個では区別がつかないクローンも存在し、この 45 個以外にも薬剤耐性遺伝子獲得・許容に関連する要因の存在が示唆された。機械学習による探索はゲノムデータの利用に有用なツールとなり得ることから、予測方法の改善、実験による検証を進める必要がある。

## A novel LAMP method detecting $\beta$ -lactamase genes 2

Jun Sakai<sup>1</sup>, Takahiro Iijima<sup>2</sup>, Dai Kanamori<sup>2</sup>, Akihiro Nakamura<sup>2</sup>, Takashi Ogihara<sup>2</sup>, Tomonori Hoshino<sup>2</sup>, Shigefumi Maesaki<sup>1</sup>, and Mitsuko Seki<sup>2</sup>

1 Saitama Medical University, Saitama, Japan.

2 Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan.

Nosocomial infections caused by  $\beta$ -lactamase-producing strains are of growing concern globally. Rapid evaluation of antimicrobial susceptibility is important in the treatment of nosocomial infections by Gram-negative bacteria, which increasingly carry carbapenemases and metallo- $\beta$ -lactamases. We developed loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based assays for two  $\beta$ -lactamase genes (*bla*<sub>IMP-1</sub> group, and *bla*<sub>VIM</sub>).

The assays were evaluated using eight reference bacterial strains (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*) harboring six  $\beta$ -lactamase genes. A total of 55 Gram-negative bacterial strains, including 47 clinical *P. aeruginosa* isolates, fully characterized by next-generation sequencing (NGS)<sup>1)</sup>, were used to evaluate the LAMP assays. The results were compared to those of conventional PCR.

The LAMP assays were able to detect 10 to 100 copies of a gene, as the same as conventional PCR. The LAMP assay detected two  $\beta$ -lactamase genes with a sensitivity like that using purified DNA as the template in DNA-spiked urine, sputum, and blood specimens. By contrast, the sensitivity of PCR was 1- to 100-fold lower with DNA-spiked clinical specimens.

Therefore, the LAMP assays were proved to be an appropriate tool for the detection of two  $\beta$ -lactamases.

Contributors: Eun Jin Kim, Donghyun Lee, and Dong Wook Kim, Hanyang University, Korea; Humphrey Gardner, Harbour Biomed, USA; Robert E McLaughlin, Institute for Life Science Entrepreneurship, USA; Paul E. Kilgore, Wayne State University, USA; Chika Takano and Satoshi Hayakawa, Nihon University School of Medicine, Japan.

Reference: 1) Kos, V.N., et al. (2015). The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 59(1), 427-436.

## *Corynebacterium striatum* の β-ラクタム薬耐性に寄与する新規耐性遺伝子の同定

黒木香澄<sup>1</sup>、久恒順三<sup>1</sup>、宮本仁志<sup>2</sup>、村上 忍<sup>2</sup>、栗本朋典<sup>3</sup>、小濱 邦彦<sup>4</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
2. 愛媛大学医学部附属病院 検査部
3. 沖縄県立南部医療センター・こども医療センター 小児科
4. 独立行政法人労働者健康安全機構 中国労災病院 中央検査部

*Corynebacterium striatum* は皮膚常在細菌であるが、β-ラクタム系抗菌薬を含む多剤に耐性を示す株による医療関連感染症が国内外で報告されており、注視が必要であると考えられる。本研究では、これまで不明だった *C. striatum* の β-ラクタム薬耐性遺伝子を同定した。入院患者の血液から分離されたペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系抗菌薬に耐性または感受性を示す菌株を収集し、全ゲノム配列を比較解析したところ、全ての耐性株は *Corynebacterium diphtheriae* の β-ラクタム薬耐性遺伝子と相同な *pbp2X* をプラスミド上に保有することがわかった。本遺伝子はペニシリン結合モチーフを持つペニシリン結合タンパク質をコードしており、*pbp2X* の上流に位置する *blaX* もペニシリン結合モチーフを含むタンパク質をコードしていた。次に、耐性株をエチジウムブロマイド添加培地で培養し、プラスミドを脱落させると β-ラクタム薬耐性は喪失した。さらに、*Pbp2X* 発現用プラスミドベクターを作製し、耐性株のプラスミド脱落株に導入すると、ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示した。一方で、*BlaX* 発現用プラスミドベクターを導入しても、上記の抗菌薬に感受性だった。以上より *C. striatum* の β-ラクタム薬耐性には *pbp2X* が寄与することが明らかとなった。

## 市街地生息カラス由来 *Escherichia coli* の薬剤耐性と人獣共通感染症の潜在的病原性の評価

坂口かなえ, 瀧澤志野, 伝田智宏, 田邊瑞来, 曾我英司, 小出将太, 林航 長野由紀子, 長野則之

信州大学大学院 医学系研究科・総合医理工学研究科,

【目的】野鳥は人獣共通感染症病原体、薬剤耐性菌のリザーバーとしてそれらの伝播・拡散に関わる。しかしながら、野鳥の中でも市街地に生息する雑食性のカラスはヒト生活圏に近いにも関わらず、*Escherichia coli* の保有状況やそれらの薬剤耐性、病原性の知見はほとんどなく、本研究はこれを解明することを目的とした。

【材料と方法】2021年11月～2022年3月冬季の夕刻に松本市・諏訪市街地の集団時にてカラス65個体の新鮮落下糞便を採取し、TBX寒天培地、コリスチン(CL)1 µg/mL含有TBX寒天培地、CHROMagar mSuper CARBA/ESBL分画培地に塗抹・培養した。推定 *E. coli* を対象にMALDI-TOF MSによる同定、薬剤感受性試験を実施した。さらにWGSによる菌種の確認並びに遺伝系統、病原因子遺伝子、薬剤耐性遺伝子の解析を行った。

【結果と考察】65個体中27個体(41.5%)から推定 *E. coli* が34株検出され、MALDI-TOF MSにより全株が *E. coli* と同定された。しかしながら、digital DDH・ANI解析の結果から31株が *E. coli* と確認された。Phylogroup解析ではB1系統群が16株(51.6%)と大半を占めたが、それらのsequence type (ST)は新規ST13297を含め21のSTに分別された。一方、ヒトで病原性が高いとされるB2系統群が7株(22.6%)、D系統群が5株(16.1%)であった。*E. coli* 31株は多くのヒト病原性大腸菌の病原因子遺伝子を保有していた。特にB2系統群の5株を含めた9株が*intA*, *kpsMIII*, *papC*のいずれか2つ以上を保有し腸管外病原性大腸菌(ExPEC)に分類された。また、B2系統群全7株が尿路病原性大腸菌(UPEC)に分類された。特に高病原性クローンのB2-O6:H5-ST83-*fimH21*の2株はヒト尿路感染症・敗血症と関連する細胞壊死因子産生性大腸菌(NTEC1)の病原性に重要な細胞毒性壊死因子遺伝子*cnf1*や、多くの鳥類病原性大腸菌(APEC)関連病原遺伝子を保有する点で特徴的であった。また、ExPECのB2-O6:H1-ST73-*fimH30*の3株では重要な分泌毒素として細胞傷害性に関わるclass 1 SPATE遺伝子*sat*、腸管定着や膀胱上皮細胞の傷害などに関わるclass 2 SPATE遺伝子*pic*や*vat*の保有が認められた。B1系統群の4株及びD系統群の1株が腸管凝集性大腸菌耐熱性毒素1(EAST1)遺伝子*astA*を保有していた。

B1-O non-typeable:H23-ST224-*fimH39*の1株は広域セファロsporin系薬に耐性を示し、*bla*<sub>CTX-M-55</sub>を保有していた。本株は他系統の薬剤に対する耐性遺伝子*strA*, *strB*, *aadA5*, *sul2*, *dfiA17*, *tet(A)*も保有しており、GyrA(S83L, D87N)及びParC(S80I)のQRDRにもアミノ酸置換を有しキノロン系薬耐性であった。また、ExPEC, *cnf2*保有NTEC2に分類されるB1-O88:H8-ST446-*fimH54*の3株はCL耐性(MIC, 8 µg/mL)で、IncI2プラスミド上(全長60,727bp)に*mcr-1*を保有していた。これらのプラスミドの全塩基配列はshufflon領域を除き99.99%以上の一致率を示し、さらに先行研究(AEM 2019;85:e01661-19)で松本市下水処理場の流入下水から検出された*mcr-1*保有IncI2プラスミドとも99.98%の高い配列類似性を示していた。その他の薬剤耐性遺伝子として*bla*<sub>TEM-1B</sub>, *aph(3')-Ia*, *strA*, *strB*, *aadA5*, *sul1*, *sul2*, *dfiA5*, *dfiA7*, *dfiA14*, *tet(B)*などが複数の株で検出された。

本研究ではこれまで知られていなかったカラス由来 *E. coli* が腸管病原性大腸菌及びExPECに関連する多くの病原因子遺伝子を保有することを明らかにした。また、カラスからのESBL産生 *E. coli* の検出は国内で初めてであり、さらに*mcr-1*保有 *E. coli* の検出は世界で初めてとなる。本研究の知見は市街地のカラスが人獣共通感染症病原菌や薬剤耐性菌の潜在的なリザーバー・ベクターとなり得る可能性を示唆するものである。

## 市街地生息カラスにおける人獣共通感染症希少病原体 *Escherichia marmotae*, *E. ruyisiae*, *Vibrio cincinnatiensis* の出現

瀧澤志野, 曾我英司, 坂口かなえ, 田邊瑞来, 伝田智宏, 小出将太, 林航, 長野由紀子, 長野則之

信州大学大学院 医学系研究科・総合医理工学研究科

【目的】ヒトと生活行動圏を共有する市街地生息カラスにおけるヒト病原菌や薬剤耐性菌の保有状況はほとんど知られていない。本研究ではカラスの糞便から検出された *Escherichia* spp. 及び *Vibrio* spp. の菌種確定とそれらの病原的意義について報告する。

【材料と方法】2021年初冬から2022年冬季の夕刻に長野県諏訪市街地の集団時にて採取した5個体の新鮮落下糞便から検出された *Escherichia* spp. 3株及び *Vibrio* spp. 2株を対象に生化学的性状試験(的手法・VITEK 2), MALDI-TOF MS による菌種の同定, 薬剤感受性試験を実施した。さらに WGS による菌種の確認並びに病原因子遺伝子, 薬剤耐性遺伝子の探索等を行った。

【結果と考察】*Escherichia* spp. 3株は, VITEK 2 により2株 (strains C10-1, C54)が *E. coli* (同定確率99%), 1株 (strain C61-1)がインドール産生性と運動性の追加試験で *E. coli* と同定された。また, C10-1, C54, C61-1 は MALDI-TOF MS でも各々 score 2.09, 2.08, 2.33 で *E. coli* と同定された。しかしながら, ClermonTyping で C10-1, C54 が cryptic clade V, C61-1 が cryptic clade III に分類されたことから, digital DDH・ANI 解析を行った結果, C10-1, C54 は *E. marmotae*, C61-1 は *E. ruyisiae* と確認された。これら3株は試験した全ての抗菌薬に感性であったが, ヒト病原性大腸菌の病原因子遺伝子として *kpsMIII*, *papC* を共有し, 腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) に分類された。また, 腸管凝集性大腸菌耐熱性毒素1 (EAST1) 遺伝子 *astA* を保有していた。これら3株の系統的位置を明らかにする目的で, NCBI データベースより取得した種々材料由来 *E. marmotae* 52株, *E. ruyisiae* 12株の登録ゲノム配列を加えた全67株のゲノム系統解析を実施した。本報の *E. marmotae* 2株は特にヒト敗血症由来株とクラスターを形成し近縁の遺伝系統であることが見出された。*E. ruyisiae* については登録ゲノム数が少なくヒト由来株との関連性については不明であった。*E. marmotae* は2015年にチベット高原のヒマラヤマーマットで初めて報告された新規の菌種で, 2022年にはヒト侵襲性感染症の起原菌として報告されている。*E. ruyisiae* は2021年に海外旅行者下痢症患者で初めて報告された新規の菌種である。本報のカラス由来株はヒト病原性を有すると考えられるが, これらの2菌種は臨床検査では *E. coli* と誤同定されており, ヒト感染症での潜在的な広がりの実態を把握することが急務と考える。

*Vibrio* spp. 2株 (strains C6-3, C12-3) は TCBS 寒天培地で白糖分解性のコロニーで, オキシダーゼ陽性の湾曲したグラム陰性桿菌として確認された。好塩性試験で NaCl 0% で発育せず, 3% 及び 6% で良好な発育を示した。VITEK 2 では C6-3 が同定不能, C12-3 が *V. fluvialis* と同定された。*Vibrio* 属の菌種同定の目的で Manual of Clinical Microbiology に従い生化学的性状試験を実施した結果, 2株共に *V. cincinnatiensis* と同定された。MALDI-TOF MS でも *V. cincinnatiensis* との結果が得られたが C6-3, C12-3 共に低 score (1.74, 1.79) を示し菌種レベルでの同定の信頼性は低いものであった。digital DDH・ANI 解析で *V. cincinnatiensis* であることが確認された。2株はカルバペネム系薬を含めたβ-ラクタム系薬に低感受性 (C12-3) 又は耐性 (C6-3) を示したが, β-ラクタマーゼ産生性は認められなかった。また, *fos* を保有し fosfomycin に高度耐性を示した。さらに T2SS, T6SS, flagella, adherence, stress tolerance, quorum sensing などに関わる病原因子遺伝子を保有していた。本菌に起因するヒト感染症事例の報告はこれまでに米国の敗血症・髄膜炎, ドイツの腸炎があるが, 2022年に熊本県で血流感染を伴う皮膚軟部組織感染症が確認されている。

本報で検出された稀な3菌種 *E. marmotae*, *E. ruyisiae*, *V. cincinnatiensis* のカラスからの分離は世界で初めてであり, 人獣共通感染症の観点から公衆衛生上重要な問題を提起する。

## 猫から分離された *Acinetobacter modestus* におけるコリスチン耐性因子の解析

○佐久間理史<sup>1</sup>、橋本雅仁<sup>2</sup>、霜島正浩<sup>3</sup>、切替照雄<sup>1,4</sup>、多田達哉<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> 順天堂大学医学部微生物学講座

<sup>2</sup> 鹿児島大学理工学部

<sup>3</sup> 株式会社スギヤマゲン

<sup>4</sup> 順天堂大学大学院医学研究科微生物学

【背景及び目的】コリスチンは複数の抗菌薬に耐性を持つ多剤耐性菌に対する限られた治療薬の一つであり、医療機関だけでなく動物及び環境中から分離されるコリスチン耐性菌の報告は年々増加している。我々は 2019 年に猫から分離されたコリスチン耐性 *Acinetobacter modestus* 1 株を分離した。*A. modestus* はチェコ共和国の医療施設および環境中から分離され、2016 年に新菌種として登録された。その後、2017 年にフランスでマウス結腸からの分離報告が 1 報あるのみで分離報告はほとんどない。本研究では、コリスチン耐性 *A. modestus* におけるコリスチン耐性因子を明らかにするとともに、その特性を解析した。

【方法】2019 年に日本の動物病院で入院していた猫の鼻汁から分離された *A. modestus* 1 株を用いた。 $\beta$ -ラクタム系薬、アミノグリコシド系薬、キノロン系薬、テトラサイクリン系及びコリスチンに対する薬剤感受性試験、次世代シーケンサによる全ゲノムの決定、コリスチン耐性因子の同定を行った。さらに、同定されたホスホエタノールアミン転移酵素をコードする遺伝子を pHSG398 に導入し、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae* および *Enterobacter cloacae* 標準株にクローニングし、コリスチンに対する最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。*E. coli* 形質転換体においては Lipid A 修飾をエレクトロスプレーイオン化質量分析計で解析した。

【結果と考察】*A. modestus* 分離株の各種薬剤に対する最小発育阻止濃度を決定したところ、 $\beta$ -ラクタム系薬、アミノグリコシド系薬、キノロン系薬およびテトラサイクリン系には感受性であったが、コリスチンには 8  $\mu\text{g/ml}$  と耐性を示した。全ゲノムの塩基配列を決定したところ、本株はホスホエタノールアミン転移酵素をコードする遺伝子 *eptA\_AM* が染色体上に存在することが明らかとなった。*eptA\_AM* を取り巻く遺伝子環境は、*Acinetobacter junii* および *Acinetobacter venetianus* の *eptA* を取り巻く遺伝子環境と類似していた。プロモーターと *eptA\_AM* の両方を保有する *E. coli*、*K. pneumoniae*、*E. cloacae* の形質転換体はコントロールベクターを持つ形質転換体より、コリスチンに対しそれぞれ 32 倍、8 倍および 4 倍高い MIC を示した。エレクトロスプレーイオン化質量分析から、*EptA\_AM* が大腸菌の Lipid A を修飾することが分かった。

本研究は日本初の *A. modestus* の分離報告であり、その内因性ホスホエタノールアミン転移酵素は *Acinetobacter* 属菌だけでなく腸内細菌科細菌のコリスチン耐性に寄与することが示唆された。

**Potential resistance of *mcr-9*, a mobilized colistin resistance gene, in colistin-susceptible *Enterobacteriaceae* isolates against colistin and LL-37**

Pegah Kananizadeh<sup>1</sup>, Tatsuya Tada<sup>1</sup>, Satoshi Oshiro<sup>1</sup>, Tomomi Hishinuma<sup>1</sup>, Mari Tohya<sup>1</sup>, Teruo Kirikae<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

**ABSTRACT**

Three isolates of *Enterobacter cloacae* complex harboring *mcr-9*, a member of the colistin resistance *mcr* gene family encoded on plasmids, were susceptible to colistin, with minimal inhibitory concentrations (MICs) of 0.125–0.5 µg/ml in standard broth microdilution (BMD) tests using cation-adjusted Mueller Hinton broth (CA-MHB) in accordance with European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines. In contrast, their MICs for colistin were significantly higher (4–128 µg/ml) when BMD tests were performed using brain-heart infusion (BHI) medium, Luria-Bertani (LB) broth, tryptic soy broth (TSB), or CA-MHB supplemented with casein, tryptone or peptone. Colistin significantly induced *mcr-9* expression in a dose-dependent manner when these *mcr-9*-positive isolates were cultured in BHI or CA-MHB supplemented with peptone/casein. Pretreatment of *mcr-9*-positive isolates and *E. coli* DH5α harboring *mcr-9* with colistin significantly increased their survival rates against LL-37, a human antimicrobial peptide. Electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry analysis showed that a lipid A moiety of lipopolysaccharide was partially modified by phosphoethanolamine in *E. coli* DH5α harboring *mcr-9* when treated with colistin. Of 93 clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, only the *mcr-9*-positive isolates showed MICs to colistin that were at least 32-times higher in BHI than in CA-MHB. These *mcr-9*-positive isolates grew on a modified BHI agar, MCR9-JU, containing 3 µg/ml colistin. These results suggest that the BMD method using BHI is useful when performed together with the BMD method using CA-MHB to detect *mcr-9*-positive isolates, and that MCR9-JU agar is useful in screening for *Enterobacteriaceae* isolates harboring *mcr-9* and other colistin-resistant isolates.

## *mcr-1* 保有プラスミドの付与が及ぼす大腸菌の病原性減弱メカニズムの解明

○佐藤豊孝<sup>1,2,3,4</sup>、山本聡<sup>4</sup>、小笠原徳子<sup>4</sup>、臼井優<sup>5</sup>、鈴木仁人<sup>6</sup>、林航<sup>7</sup>、長野則之<sup>7</sup>、土井洋平<sup>8,9</sup>、田村豊<sup>10</sup>、高橋聡<sup>11,12</sup>、横田伸一<sup>4</sup>、堀内基弘<sup>1,2,3</sup>、

1, 北海道大学・大学院獣医学研究院・獣医衛生学; 2, 北海道大学・大学院国際感染症学院; 3, 北海道大学・One Health リサーチセンター; 4, 札幌医科大学・医学部・微生物学; 5, 酪農学園大学・獣医学群・食品衛生学; 6, 国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター; 7, 信州大学大学・院総合医理工学研究科・医学系専攻; 8, ピッツバーグ大学医学部・感染症内科; 9, 藤田医科大学・微生物学・感染症科; 10, 酪農学園大学・名誉教授; 11, 札幌医科大学附属病院・検査部; 12, 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。耐性の付与と伝達が問題となるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子(*mcr*)は特に畜産領域における腸内細菌科細菌からの報告が多い。一方で、我々は、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。さらに、*mcr* 保有プラスミド (pIncI2\_ *mcr-1*, pIncX4\_ *mcr-1*, pIncP1\_ *mcr-3*, pIncFII\_ *mcr-5*) および *pmrAB* に認められた遺伝子変異を、international high-risk clone で多剤耐性化が懸念されている大腸菌 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)での病原性、定着性を評価した結果、一部のプラスミド性コリスチン耐性機構 (pIncI2\_ *mcr-1*, pIncX4\_ *mcr-1*, pIncP1\_ *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を明らかにした。本研究では、pIncI2\_ *mcr-1* に着目し、本プラスミド導入による病原性および宿主定着性の低下メカニズムの解明をおこなった。

RNA-Seq 解析の結果、pIncI2\_ *mcr-1* の付与は ST131 の遺伝子発現を大きく変化させていることを明らかにした。また、pIncI2\_ *mcr-1* プラスミドの導入株から *mcr-1* を特異的に欠損させても本遺伝子発現に大きな変化はなく、マウスに対する病原性および定着性の低下に変化は認められなかった。一方で、*mcr-1* の近傍に存在する 2 種類の hypothetical proteins をコードする遺伝子 (*hypo-1* および *hypo-3*) を欠損させた株ではマウスへの病原性が復帰した。

以上から、pIncI2\_ *mcr-1* プラスミドの付与による病原性・定着性の低下への *mcr-1* の関与は小さく、*hypo-1* および *hypo-3* の関与が示唆された。

## 海外入院歴を有する患者から分離された複数のカルバペネマーゼ産生菌の ゲノム解析

西田 智<sup>1</sup>、吉野友祐<sup>1</sup>、斧 康雄<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>帝京大学医学部微生物学講座、<sup>2</sup>帝京平成大学健康メディカル学部

【目的】カルバペネマーゼ産生菌（CPO）による感染症は有効な治療薬の少ないことから临床上重要な問題となっている。海外入院歴のある一人の患者から 3 種の CPO と 1 種の ESBL 産生菌が分離された。それぞれ CPE（カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌）、MDRP（多剤耐性緑膿菌）、MDRA（多剤耐性アシネトバクター）、ESBL 産生菌と同定された。これら複数の多剤耐性菌の耐性機序の解明を目的として全ゲノム配列（WGS）解析を行った。

【方法】臨床分離株は 2016 年に帝京大学医学部附属病院においてインドネシアで入院歴のある一人の患者から分離された。同定は MALDI-TOF MS を用いて行った。薬剤感受性は MicroScan WalkAway (Beckman Coulter) および微量液体希釈法を用いて評価した。WGS は、ショートリードシーケンサー Illumina MiSeq とロングリードシーケンサー Oxford Nanopore GridION および PacBio RSII を用いて決定した。

【結果】薬剤感受性解析では、CPE が PDR（汎薬剤耐性）、MDRP と MDRA が XDR（超多剤耐性）、ESBL 産生菌が MDR（多剤耐性）であることが明らかとなった。WGS 解析では、CPE に KPC-2, SHV-12, TEM-1, CTX-M-65、MDRA に TEM-1, OXA-23, OXA-66、MDRP に IMP-7、ESBL 産生菌に TEM-1, CTX-M-3 の各遺伝子が検出された。CPE のコリスチンおよびチゲサイクリン耐性遺伝子として、*mgrB* と *ramR* の変異がそれぞれ検出された。MLST 解析では、CPE が ST11 型肺炎桿菌、MDRP が ST357、MDRA は ST1050 (Oxford)、ESBL 産生菌は ST22 型 *Citrobacter freundii* であった。

【考察】このようなスーパー耐性菌の薬剤耐性機序の解明に WGS 解析が有効であった。各 MLST 型の耐性菌は主にアジアパシフィックでの流行が見られるので、引き続き海外からの流入監視、早期検出及び感染制御が重要と考えられる。

【参考文献】 Nishida S, Ono Y. Int J Antimicrob Agents. 2020; 55(4):105854.  
Nishida S *et al.* Int J Antimicrob Agents. 2018; 52(4):512-514.

## カルバペネム耐性緑膿菌臨床分離株で見出された VIM-24 メタロ $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子反復配列

○菱沼知美<sup>1</sup>、多田達哉<sup>1</sup>、遠矢真理<sup>1</sup>、新谷政己<sup>2</sup>、鈴木仁人<sup>3</sup>、小川美保<sup>4</sup>、霜島正浩<sup>4,5</sup>、佐藤浩司<sup>1</sup>、切替照雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>順天堂大学大学院医学研究科微生物学、<sup>2</sup>静岡大学大学院工学領域、<sup>3</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター、<sup>4</sup>株式会社ビー・エム・エル、<sup>5</sup>株式会社スギヤマゲン)

【目的】多剤耐性緑膿菌(MDRP)の新興と伝播が日本の医療施設で問題となっている。日本で分離される MDRP が産生するカルバペネマーゼの大部分は、IMP 型メタロ  $\beta$  ラクタマーゼ (MBL) であった。しかし近年 GES 型カルバペネマーゼと共に VIM 型 MBL 産生菌の分離率が緩やかに増加している。2012 年から 2019 年に分離されたプラスミド由来の VIM 型 MBL 産生菌 13 株のゲノム解析を行った結果、13 株中 4 株で 2 つの *bla*<sub>VIM-24</sub> が反復配列 (タンデムリピート) で検出された。本研究では、*bla*<sub>VIM-24</sub> をタンデムリピートに保有するカルバペネム耐性緑膿菌の細菌学的特性を解析した。

【方法】愛媛県の医療施設で分離された、プラスミド 上に *bla*<sub>VIM-24</sub> をタンデムリピートに保有する VIM 型産生緑膿菌 4 株 (NCGM3596、NCGM3741、NCGM3822 および NCGM3814\_2) を用いた。緑膿菌 PAO1 へのプラスミドの接合伝達試験をフィルター接合及び液体接合で実施した。シャトルベクター pUCP19 に 1 コピー *bla*<sub>VIM-24</sub> およびタンデムリピート *bla*<sub>VIM-24</sub> をクローニングし、緑膿菌 PAO1 へ導入した。これら緑膿菌 PAO1 形質転換体を用いて、1/2MIC 濃度のメロペネムおよびセフェピム存在下での growth kinetics assay および time-killing assay を実施した。ウェスタンブロットティングにより VIM タンパク発現量を解析した。

【結果と考察】フィルター接合では、全てのプラスミドにおいて *P. aeruginosa* PAO1 へ接合伝達を生じた ( $1.8 \times 10^{-7} \sim 7.0 \times 10^{-6}$ )。液体接合では、4 つのプラスミド 中、2 つのプラスミド (pNCGM3741 および pNCGM3822) は *P. aeruginosa* PAO1 へ接合した ( $8.6 \times 10^{-6}$  および  $2.6 \times 10^{-6}$ )。プラスミド が接合伝達された *P. aeruginosa* PAO は cefepime, ceftazidime, imipenem および meropenem に対して耐性を獲得した。1 コピー *bla*<sub>VIM-24</sub> およびタンデムリピート *bla*<sub>VIM-24</sub> を導入した緑膿菌 PAO1 形質転換体 (PAO1:: *bla*<sub>VIM-24</sub> および PAO1:: *bla*<sub>VIM-24</sub>*bla*<sub>VIM-24</sub>) は、それぞれ cefepime, ceftazidime, imipenem および meropenem に対して耐性を獲得したが、両形質転換体において MIC に差はなかった。両形質転換体の 1/2MIC 濃度のメロペネム存在下の growth は、薬剤無と比較して同様に抑制されていた。一方、1/2MIC 濃度のセフェピム存在下の growth は、PAO1:: *bla*<sub>VIM-24</sub>*bla*<sub>VIM-24</sub> はほとんど影響を受けなかった。ウェスタンブロットティングの結果、PAO1:: *bla*<sub>VIM-24</sub>*bla*<sub>VIM-24</sub> の VIM-24 の発現は PAO1:: *bla*<sub>VIM-24</sub> と比較して 2.6 倍高かった。以上の結果から、カルバペネム耐性緑膿菌の *bla*<sub>VIM-24</sub> タンデムリピートが 1/2MIC セフェピムに対する耐性を与えることにより、日本の医療施設で拡大していくことが示唆された。







ホーム



研究会概要



研究会案内



国内耐性菌情報



海外耐性菌情報



耐性菌Q&A



会則



入会案内



アクセス



お問い合わせ



群馬大学文部科学省特別プロジェクト事業

多剤薬耐性菌制御のための  
薬剤耐性菌研究者育成と  
細菌学的専門教育

## Information

- 2022.9.8 第51回薬剤耐性菌研究会における「Zoom配信についてのページ」をアップしました。  
COVID-19の流行情勢を鑑み、昨年と同様に「視聴のみ」ではありますが、Zoomによる配信も行うことを決定いたしました。配信を希望される方はご覧ください。
- 2022.7.7 2022.6.22第51回 薬剤耐性菌研究会のページをアップしました。  
参加登録と抄録原稿の募集を開始しました。  
参加登録締め切り: 2022年10月7日  
抄録原稿締め切り: 2022年10月17日  
参加登録票に必要事項を記入した後、事務局までメール添付でお送りください。
- 2021.11.15 第51回薬剤耐性菌研究会が2022年11月11日(金)、12日(土)に群馬県安中市磯部のホテル磯部ガーデンで開催されることが決まりました。詳細はこちらのページをご覧ください。
- 2021.11.15 第50回薬剤耐性菌研究会(開催当番: 切替先生(順天堂大学医学部))を11月12日(金)、13日(土)に伊豆の国市で多くの方々の参加を頂き、盛会のうちに終了することが出来ました。参加者の皆様には手指の消毒、マスクの常時着用、室内の換気などの感染対策にご協力頂き感謝いたします。また、Zoomにてご視聴頂いた皆様にも御礼申し上げます。  
プログラムのpdfを「研究会案内」のページにアップしましたのでご覧ください。