

第46回薬剤耐性菌研究会

プログラム・抄録集

平成29年11月10日(金)・11日(土)

群馬県水上ホテル聚楽

第46回薬剤耐性菌研究会

会期：平成29年11月10日（金）12:55～
平成29年11月11日（土）12:05

会場：水上ホテル聚楽
2階（フロント階）コンベンションホール『コンコルド』

〒379-1617 群馬県利根郡みなかみ町湯原 665 Tel:0278-72-2521
<http://www.hotel-juraku.co.jp/minakami/>

会長：菅井 基行（広島大学院内感染症プロジェクト研究センター）
開催当番：富田 治芳（群馬大学・院・医 細菌学/附属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・薬剤耐性菌実験施設
代表：富田 治芳

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



The Society for Bacterial Drug Resistance
薬剤耐性菌研究会

→ Home → Access → Contact us
→ 群馬大学大学院医学系研究科附属 薬剤耐性菌実験施設

Home
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
会期
入会案内
アクセス
お問い合わせ

群馬大学大学院医学系研究科附属プロジェクト事業
多剤薬剤耐性菌制御のための
薬剤耐性菌研究者育成と
細菌学の専門教育

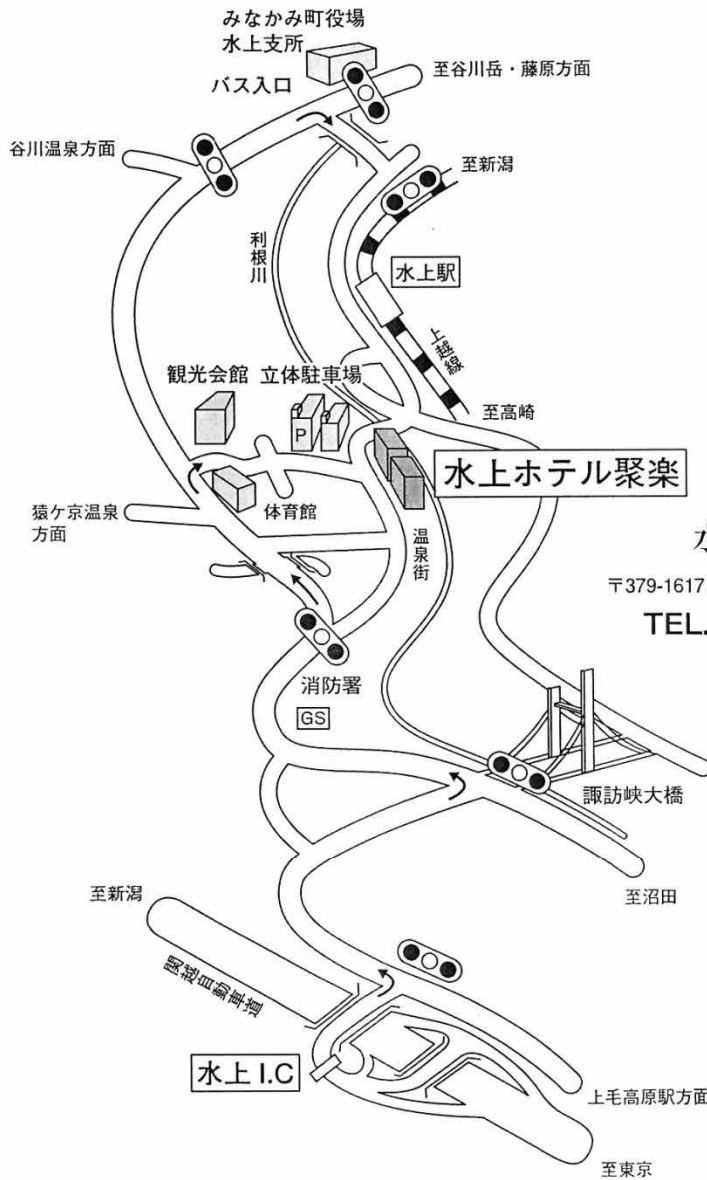
Information

- 2017.10.24 第46回 薬剤耐性菌研究会のページを更新し、プログラムをアップしました。
- 2017.10.2 第46回 薬剤耐性菌研究会の特別講演に、北京大学教授であり中国の薬剤耐性菌サーベランスの責任者の一人であるDr. Zheng氏を招聘いたしました。
- 2017.9.29 耐性菌情報（海外）のページ、耐性菌情報（国内）のページを更新しました。
- 2017.9.21 耐性菌Q&Aのページ（Q&A 60, 61）を更新しました。
- 2017.9.15 耐性菌情報（海外）のページ、耐性菌情報（国内）のページを更新しました。
- 2017.7.25 第46回 薬剤耐性菌研究会のページをアップしました。
参加登録締め切り：2017年10月6日
抄録原稿締め切り：2017年10月16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。
- 2017.7.21 耐性菌情報（海外）のページ、耐性菌情報（国内）のページを更新しました。
- 2017.7.14 耐性菌情報（海外）のページを更新しました。
- 2017.7.7 耐性菌情報（海外）のページを更新しました。
- 2017.6.27 耐性菌情報（国内）のページを更新しました。

薬剤耐性菌研究会 事務局：〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-22 Copyright © The Society for Bacterial Drug Resistance. All rights reserved.

<http://yakutai.dept.med.gunma-u.ac.jp/society/index.html>

ご案内図



水上ホテル聚楽

〒379-1617 群馬県利根郡みなかみ町湯原 665

TEL.(0278)72-2521(代)

上越線水上駅下車
タクシー 3分
マイク口送迎有
(13:00~16:30)

上越新幹線
上毛高原駅下車
タクシー 20分

上毛高原駅より
路線バス 25分
水上駅下車 ¥620
水上駅より送迎バス有り(要予約)

～ご参考までに、お帰りの電車時刻(上り)～

(バスで約 25 分)

上越新幹線 上毛高原駅 発 12:21、13:21、14:21

(バスで約 3 分)

上越線 水上駅 発 13:14、14:19、14:45

ご案内

1. 参加受付

受付は11月10日（金）11:30より2F（フロント階）コンベンションホール「コンコルド」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7,000円）

3. 口演発表

- ・一般演題の口演時間は10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（windows8.1, 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46回薬剤耐性菌研究会プログラム

平成29年11月10日(金)

12:55~18:00

12:55~13:00

開会の挨拶

菅井 基行(広島大学)

一般演題：発表12分、討論3分

13:00~

座長：鹿山 鎮男(広島大学)

各種薬剤耐性／耐性機構

食肉から分離した腸球菌のバシトラシン耐性についての研究

○杉岡佳祐¹，野村隆浩¹，久留島 潤¹，谷本弘一²，富田治芳^{1,2}

(¹群馬大 院医 細菌学，²群馬大 院医 薬剤耐性菌実験施設)

国内2つの医療機関にて分離されたVanB型バンコマイシン感受性腸球菌に関する分子生物学的研究

○橋本佑輔¹，野村隆浩¹，玉井清子³，柳沢英二³，調 恒明⁴，谷本弘一²，富田治芳^{1,2}

(¹群馬大 院医 細菌学，²群馬大 院医 薬剤耐性菌実験施設，³(株)ミロクメディカルラボラトリー，⁴山口県環境保健センター)

β-ラクタム系薬の選択圧の違いがB群レンサ球菌のβ-ラクタム系薬低感受性化へ及ぼす影響

○小出将太¹，小坂駿介¹，谷口唯¹，林航¹，大崎裕介¹，木村幸司²，長野由紀子²，荒川宜親²，長野則之¹

(¹信州大学大学院 医学系研究科，²名古屋大学大学院 医学系研究科)

13:45-14:15

グラム陰性桿菌におけるホスホマイシン分解酵素FosAの検索と新規阻害薬の探索

○Yohei Doi^{1,2}，Ryota Ito²，Adam Tomich¹，Nicolas Sluis-Cremer¹

(¹ピッツバーグ大学医学部感染症内科学，²藤田保健衛生大学医学部微生物学)

14:15～

座長:平川 秀忠(群馬大学)

国内の種々材料由来腸内細菌科細菌におけるコリスチン耐性機序の多様性

○林航¹, 谷口唯¹, 大崎裕介¹, 小出将太¹, 小坂駿介¹, 長野由紀子², 荒川宜親², 長野則之¹

(¹信州大学大学院 医学系研究科, ²名古屋大学大学院 医学系研究科)

グラム陰性菌多剤排出トランスポーター複合体の構成と構造

○林克彦¹, 中島良介², 櫻井啓介², 西野-林美都子¹, 山崎聖司¹, 北川公恵², 山口明人², 西野邦彦¹

(¹大阪大学・産業科学研究所・生体分子制御科学研究分野, ²大阪大学・産業科学研究所・生体防御学研究分野)

~~~~~**coffee break 14:45~15:00**~~~~~

15:00～

座長:中村 明子(三重大学)

### ESBL / $\beta$ -lactamase

#### 鶏肉検体からの ESBL、AmpC 産生腸内細菌科細菌の分離と解析

○大竹洋輔<sup>1</sup>, 千葉菜穂子<sup>1</sup>, 久留島潤<sup>1</sup>, 谷本弘一<sup>2</sup>, 富田治芳<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>群馬大・院医・細菌学, <sup>2</sup>群馬大・院医・薬剤耐性菌実験施設)

#### 市販鶏肉由来 ESBL 産生 *Escherichia coli* の遺伝学的特性

○大崎裕介<sup>1</sup>, 林航<sup>1</sup>, 谷口唯<sup>1</sup>, 小出将太<sup>1</sup>, 小坂駿介<sup>1</sup>, 長野由紀子<sup>2</sup>, 荒川宜親<sup>2</sup>, 長野則之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科, <sup>2</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科)

#### 健康人および鶏肉間における CTX-M-8 ESBL 遺伝子の水平伝播は IncI1/ST113 に より媒介される

○法月千尋<sup>1,2</sup>, 和知野純一<sup>3</sup>, 鈴木匡弘<sup>4</sup>, 川村久美子<sup>1</sup>, 荒川宜親<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科 医療技術学専攻, <sup>2</sup>公立陶生病院 臨床検査部, <sup>3</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科 分子病原細菌学, <sup>4</sup>藤田保健衛生大学 医学部 微生物学講座)

## 愛玩動物臨床由来セフトキシム耐性 *Enterobacteriaceae* における CTX-M-27

### ESBL 産生 *E. coli* B2-O25b-ST131-H30R クローンの高頻度分布

○谷口唯<sup>1</sup>，林 航<sup>1</sup>，大崎裕介<sup>1</sup>，小出将太<sup>1</sup>，小坂駿介<sup>1</sup>，前山佳彦<sup>1,2</sup>，玉井清子<sup>2</sup>，長野由紀子<sup>3</sup>，荒川宜親<sup>3</sup>，長野則之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科，<sup>2</sup>ミロクメディカルラボラトリー，<sup>3</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科)

16:00～

座長：松本 竹久（群馬大学）

### 大腸菌由来 CTX-M 型 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子保有プラスミドの系統ネットワーク解析

○鈴木匡弘<sup>1,2</sup>，和知野純一<sup>3</sup>，川村久美子<sup>4</sup>，長野則之<sup>5</sup>，荒川宜親<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>藤田保衛大・医・微生物，<sup>2</sup>愛知衛研・細菌，<sup>3</sup>名大・医・細菌学，<sup>4</sup>名大・保健・細菌学，<sup>5</sup>信州大・保健・細菌学)

### 在宅医療患者および介護施設入所者等における基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌率と分子疫学解析

○林謙吾<sup>1</sup>，川村久美子<sup>1</sup>，北岡一樹<sup>2</sup>，木村幸司<sup>2</sup>，和知野純一<sup>2</sup>，飯沼由嗣<sup>3</sup>，村上啓雄<sup>4</sup>，藤本修平<sup>5</sup>，荒川宜親<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>名大院・医・医療技術，<sup>2</sup>名大院・医・細菌，<sup>3</sup>金沢医大・臨床感染症学，<sup>4</sup>岐阜大・医・附属病院・生体支援センター，<sup>5</sup>東海大・医・生体防御学)

### $\beta$ -lactamase 産生 *Capnocytophaga* 属菌における CSP 型 $\beta$ -lactamase 遺伝子の保有状況

○高橋 啓<sup>1</sup>，松本 竹久<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>群馬大学 医学部保健学科，<sup>2</sup>群馬大学大学院保健学研究科)

16:45～

### 感染対策

#### 耐性菌関連電子システム開発の現状 —耐性菌条件/警告・案内定義メッセージの標準化・RICSS・2DCM-web の進捗—

○藤本修平<sup>1</sup>，谷本弘一<sup>2</sup>，富田治芳<sup>2</sup>，八木哲也<sup>3</sup>，柴山恵吾<sup>4</sup>，荒川宜親<sup>3</sup>，村上啓雄<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>東海大学，<sup>2</sup>群馬大学，<sup>3</sup>名古屋大学，<sup>4</sup>国立感染症研究所，<sup>5</sup>岐阜大学)

~~~~~coffee break 17:00~17:10 ~~~~~

17:10～

座長：柴山 惠吾 (国立感染症研究所)

特別講演

AMR surveillance in China

○Bo Zheng¹, Xiaolin Liu² and Yuan Lv¹

¹Institute of Clinical Pharmacology, Peking University
First Hospital, Beijing, China

²Committee of Experts on Rational Drug Use, National Health and
Family Planning Commission, Beijing, China

2 日目

平成 29 年 11 月 11 日 (土)

8:45~12:05

一般演題：発表 12 分、討論 3 分

8:45~

座長：土井 洋平(ピッツバーグ大学)

カルバペネム耐性

サブクラス B3 メタロ-βラクタマーゼ SMB-1 の阻害剤探索

○金地玲生, 和知野純一, 木村幸司, 荒川宜親

(名古屋大・院・医 分子病原細菌学/耐性菌制御学)

新規メタロ-βラクタマーゼ阻害化合物等の探索と開発へのチャレンジ

○荒川宜親¹, 和知野純一¹, 木村幸司¹, 佐藤綾人², 黒崎博雅³, 金 万春¹,
Anupriya Kumar¹, 金山堯人¹, 金地玲生¹, 坂野弘嗣¹, 北岡一樹¹

(¹名古屋大・院・医 分子病原細菌学/耐性菌制御学, ²名古屋大・トランスフォー
マティブ生命分子研究所 ITbM・ケミカルライブラリーセンター, ³金城学院大・
薬・機器分析学/薬品分析学)

東日本で検出されたカルバペネム耐性大腸菌の遺伝子解析結果

○小川美保, 坂田竜二, 市村禎宏

(株式会社ビー・エム・エル 細菌検査部)

ネパールの医療施設で分離されたカルバペネム耐性大腸菌の分子疫学解析

○多田達哉¹, Basudha Shrestha², 島田佳世³, Jeevan B. Sherchand², 菱沼知美¹, 切替照雄¹

(¹順天堂大学大学院医学研究科微生物学, ²トリブバン大学医学部微生物学, ³国
立国際医療研究センター研究所感染症制御研究部)

広島県で分離された多剤耐性 *Acinetobacter* が保有する GES-24 プラスミドの解析

○鹿山鎮男^{1,2}, 矢野雷太^{1,2,3}, 久恒順三^{1,2}, 山下明史⁴, 黒田誠⁴, 鈴木仁人⁵, 矢
原耕史⁵, 鈴木里和⁵, 柴山恵吾⁵, 大毛宏喜^{1,6}, 菅井基行^{1,2}

(¹広島大学院内感染プロジェクトセンター, ²広島大学大学院医歯薬保健学研究科
細菌学, ³広島大学大学院医歯薬保健学研究科 外科学, ⁴国立感染症研究所 病
原体ゲノム解析研究センター, ⁵国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター, ⁶広島
大学病院 感染症科)

Acinetobacter baumannii の接合伝達における VI 型分泌機構の影響

○吉田真歩^{1,2}, 平林亜希², 荒川宜親¹, 柴山恵吾², 鈴木仁人²

(¹名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学/耐性菌制御学研究室, ²国立感染症研究所 薬剤耐性菌研究センター)

~~~~~coffee break 10:15~10:30 ~~~~~

10:30~

座長:鈴木 匡弘(藤田保健衛生大学)

## 検査方法

### 核酸クロマトを用いたカルバペネマーゼ遺伝子検出キットの有用性評価

○田寺加代子<sup>1,2</sup>, 鹿山鎮男<sup>1,2</sup>, 池田光泰<sup>1,2</sup>, 原稔典<sup>1,2</sup>, 黒尾優太<sup>1,2</sup>, 宮本重彦<sup>3</sup>, 直原啓明<sup>3</sup>, 菅井基行<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>広島大学 院内感染プロジェクトセンター, <sup>2</sup>広島大学大学院医歯薬保健学研究科 細菌学, <sup>3</sup>株式会社カネカ Medical Devices Solutions Vehicle)

## 地方衛生研究所のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌検査を迅速化するマルチプレックス PCR 法の開発

○綿引正則<sup>1</sup>, 鈴木匡弘<sup>2</sup>, 熊谷優子<sup>3</sup>, 松本裕子<sup>4</sup>, 範本志保<sup>1</sup>, 野田万希子<sup>5</sup>, 河原隆二<sup>6</sup>, 増田加奈子<sup>7</sup>, 仙波敬子<sup>8</sup>, 福田千恵美<sup>9</sup>, 原田誠也<sup>10</sup>, 松井真理<sup>11</sup>, 鈴木里和<sup>11</sup>, 鈴木仁人<sup>11</sup>, 柴山恵吾<sup>11</sup>, 四宮博人<sup>8</sup>

(<sup>1</sup>富山県衛生研究所・細菌部, <sup>2</sup>愛知県衛生研究所・生物学部\*, <sup>3</sup>秋田県健康環境センター・保健衛生部, <sup>4</sup>横浜市衛生研究所・微生物検査研究課, <sup>5</sup>岐阜県健康環境研究所・保健科学部, <sup>6</sup>大阪健康安全基盤研究所・微生物部, <sup>7</sup>広島県立総合技術研究所・保健環境センター, <sup>8</sup>愛媛県立衛生環境研究所・衛生研究課, <sup>9</sup>香川県環境保健研究センター・微生物細菌, <sup>10</sup>熊本県健康環境科学研究所・微生物科学部, <sup>11</sup>国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター)

## Drug Susceptibility Testing Microfluidic device (DSTM)を用いた血液培養陽性検体の迅速感受性検査法の検討

○坂田竜二<sup>1</sup>, 小川美保<sup>1</sup>, 市村禎宏<sup>1</sup>, 霜島正浩<sup>1</sup>, 松本佳巳<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>株式会社ビー・エム・エル 細菌検査部, <sup>2</sup>株式会社フコク, <sup>3</sup>大阪大学 産業科学研究所)

## MAIDI-TOF MS データを用いたバンコマイシン低感受性 MRSA 株の自動判別

朝倉弘太<sup>1</sup>，畦地拓哉<sup>1</sup>，笹野央<sup>1</sup>，松井秀仁<sup>2</sup>，花木秀明<sup>2</sup>，宮崎元康<sup>3</sup>，高田徹<sup>4</sup>，  
関根美和<sup>5</sup>，高久智生<sup>6</sup>，落合友則<sup>6</sup>，小松則夫<sup>6</sup>，柴山恵吾<sup>7</sup>，片山由紀<sup>5</sup>，○矢原  
耕史<sup>7</sup>

(<sup>1</sup>順天堂大学医学部附属順天堂医院 薬剤部，<sup>2</sup>北里大学北里生命科学研究所 感染  
制御研究センター，<sup>3</sup>福岡大学筑紫病院 薬剤部，<sup>4</sup>福岡大学病院 感染制御部，<sup>5</sup>  
順天堂大学 医学部・微生物学講座，<sup>6</sup>順天堂大学 医学部・血液学講座，<sup>7</sup>国立感  
染症研究所 薬剤耐性研究センター)

11:30～

### 疫学調査

#### 携帯型実験機器を用いたアジア新興国現地での薬剤耐性菌のゲノム疫学解析

○平林亜希<sup>1</sup>，柳沢英二<sup>2</sup>，高橋宏瑞<sup>3</sup>，矢原耕史<sup>1</sup>，柴山恵吾<sup>1</sup>，鈴木仁人<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>株式会社マイクロスカイラボ，  
<sup>3</sup>順天堂大学医学部 総合診療科)

#### JANIS 検査部門薬剤耐性菌分離率の推移と2016年地域別耐性菌分離状況報告

○川上小夜子，矢原耕史，筒井敦子，柴山恵吾

(国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター)

12:00～12:05

閉会の挨拶



11月10日（金）17:10～

特別講演 抄録

# **AMR surveillance in China**

**○Bo Zheng<sup>1</sup>, Xiaolin Liu<sup>2</sup> and Yuan Lv<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Clinical Pharmacology, Peking University  
First Hospital, Beijing, China

<sup>2</sup>Committee of Experts on Rational Drug Use, National Health and Family  
Planning Commission, Beijing, China



## AMR surveillance in China

○Bo Zheng<sup>1</sup>, Xiaolin Liu<sup>2</sup> and Yuan Lv<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Clinical Pharmacology, Peking University First Hospital, Beijing, China

<sup>2</sup>Committee of Experts on Rational Drug Use, National Health and Family Planning Commission, Beijing, China

China Antimicrobial Resistance Surveillance System (CARSS) was established in 2005, up to now the CARSS network has enrolled 1412 hospitals which are secondary or tertiary hospitals in 31 provinces, autonomous regions, and municipalities in China. The network can dynamically monitor the resistance trends of the clinical important pathogens, and timely warn the healthcare authorities of the emerging MDR pathogens. The CARSS system consisted of three regional administrative centers and one quality control center, which guarantee the coverage of the healthcare facilities and the quality of the data. It helps Chinese government and healthcare workers controlling the antimicrobial resistance in China in a timely and comprehensive manner.

According to the surveillance data gathered by CARSS, the top 5 most prevalent gram-positive bacteria were *Staphylococcus aureus* (32.2%), *Staphylococcus epidermidis* (12.8%), *Enterococcus faecalis* (9.7%), *Streptococcus pneumoniae* (9.3%), and *Enterococcus faecium* (8.9%). The top 5 most prevalent gram-negative bacteria were *Escherichia coli* (29.9%), *Klebsiella pneumoniae* (19.8%), *Pseudomonas aeruginosa* (12.9%), *Acinetobacter baumannii* (10.7%), and *Enterobacter cloacae* (4.3%).

From 2011 to 2015, the prevalence of MRSA, third-generation cephalosporin resistant *Escherichia coli*, and third-generation cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* had dropped from 51.8%, 71.8%, and 62.3% to 35.8%, 59.0%, and 36.5%, respectively. The prevalence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* has also declined in the past two years. The prevalence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* has increased from 4.8% to 7.6%. The resistance of *Enterococcus faecium* to vancomycin remained relatively stable at less than 5%. No vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strain has been identified in China.





# 一般演題抄録集



## 食肉から分離した腸球菌のバシトラシン耐性についての研究

○杉岡 佳祐<sup>1</sup>、野村 隆浩<sup>1</sup>、久留島 潤<sup>1</sup>、谷本 弘一<sup>2</sup>、富田 治芳<sup>1,2</sup>  
群馬大 院医 細菌学<sup>1</sup>、群馬大 院医 薬剤耐性菌施設<sup>2</sup>

【背景】現在、ヒトに用いられる主要な抗菌薬と同等の薬剤の家畜への投与、治療薬としての使用は禁止されている。しかし、一部は飼料添加物として国内外で未だに広く用いられており、ポリペプチド系抗菌薬であるバシトラシン(BC)もそのひとつである。

ヒトや畜産動物の腸管内常在菌である腸球菌は、抗菌物質の(経口)投与と薬剤耐性化との関係が比較的明確にされている。本研究では平成 28 年度及び平成 29 年度にそれぞれ収集した食肉検体を用い、複数回の調査、解析を行うことで、食肉検体由来の腸球菌における BC の薬剤耐性および他の抗菌薬耐性との関連性を明らかにすることを目的としている。

【材料・方法】《平成 28 年度》合計 226 の食肉(鶏肉)検体を食肉検査所(国内)と輸入検疫所(国外)から収集し、BC 含有および非含有腸球菌分離用培地を用いて腸球菌を分離した。分離株を対象に BC 耐性に寄与する *bcrD* 遺伝子の保持状況およびバシトラシンの MIC(最小発育阻止濃度)値を測定し、ブレイクポイント値を設定した。ブレイクポイント値以上の株を対象に接合伝達実験と各種抗菌薬の MIC 値を測定した。

《平成 29 年度》合計 296 の食肉(鶏肉、豚肉、牛肉)検体を食肉検査所(国内)と輸入検疫所(国外)から収集し、上記の平成 28 年度と同様に腸球菌の分離、*bcrD* 遺伝子の保持状況の解析およびバシトラシンの MIC 値の測定、ブレイクポイント値の検証を行った。現在、ブレイクポイント値以上の株を対象に接合伝達実験と各種抗菌薬の MIC 値の測定を行っている。

【結果・考察】《平成 28 年度》収集した食肉検体から薬剤非含有培地を用いて腸球菌 274 株を分離し、うち 46 株(16.8%)が *bcrD* 遺伝子を保持していた。また、BC 含有培地を用いて、226 検体中 88 検体(38.9%)から *bcrD* 遺伝子を保持する腸球菌 174 株を得た。これらの分離株の BC の MIC 値を解析し、腸球菌のブレイクポイント値を 32 units/ml と設定した。接合伝達実験では BC 耐性腸球菌 205 株中 47 株において BC 耐性の伝達性が確認された。各種抗菌薬の MIC 値の測定では BC 耐性とエリスロマイシン、テトラサイクリン、アミノグリコシド系薬剤の耐性との関係が示唆された。

《平成 29 年度》収集した食肉検体から薬剤非含有培地を用いて腸球菌 384 株を分離し、うち 78 株(20.1%)が *bcrD* 遺伝子を保持していた。また、BC 含有培地を用いて、296 検体中 122 検体(41.2%)から *bcrD* 遺伝子を保持する腸球菌 237 株を得た。これらの分離株の BC の MIC 値を解析したところ、腸球菌のブレイクポイント値は平成 28 年度と同様に 32 units/ml となった。現在、ブレイクポイント値以上の株を対象に接合伝達実験と各種抗菌薬の MIC 値の測定を行っており、今後プラスミドの単離、プラスミドの構造解析を行っていく予定である。

国内 2 つの医療機関にて分離された VanB 型バンコマイシン感受性腸球菌に関する  
分子生物学的研究

○橋本 佑輔<sup>1</sup>、野村 隆浩<sup>1</sup>、玉井 清子<sup>3</sup>、柳沢 英二<sup>3</sup>、調 恒明<sup>4</sup>、  
谷本 弘一<sup>2</sup>、富田 治芳<sup>1,2</sup>  
群馬大 院医 細菌学<sup>1</sup>、群馬大 院医 薬剤耐性菌実験施設<sup>2</sup>、  
(株)ミロクメディカルラボラトリー<sup>3</sup>、山口県環境保健センター<sup>4</sup>

【目的】

近年海外にて、バンコマイシン(VAN)耐性遺伝子を保持しながらも VAN 感受性を示し、定型的検査では発見困難な腸球菌が、治療中に VAN 耐性へ復帰変異した症例が複数報告されている。

【方法】

国内 2 つの医療機関の入院患者の便検体より得られた VAN MIC 値 3mg/L を示す VanB 型 VAN 感受性腸球菌 *E. faecium* 19 株について解析を行った。

【結果】

9 株の薬剤耐性及び PFGE パターンは極めて類似し、MLST 解析にて院内アウトブレイクに関連のある ST78 に属していた。VanB 型耐性遺伝子の塩基配列も 19 株全てで一致し、高度耐性 VanB 型 VRE の塩基配列と比較すると、*vanS<sub>B</sub>*、*vanW*、*vanB* の 3 つの遺伝子に特異的な変異が認められた。この VanB 型耐性遺伝子は実験株へ  $10^{-6} \sim 10^{-8}$ /donor cell の頻度で接合伝達が可能であった。これら感受性株は薬剤非存在下にて  $10^{-6} \sim 10^{-7}$ /cell の頻度で VAN 耐性へ復帰変異が可能であり、復帰株の定量 RT-PCR 解析では、VAN 存在下で耐性遺伝子の転写量増加を認めた。多くの復帰株で *vanS<sub>B</sub>* 遺伝子に新規変異が存在したが、耐性遺伝子内に新規変異を認めない株も複数確認された。感受性株に特異的な変異を高度耐性株の塩基配列に換える変異導入実験にて、VAN MIC の上昇を認めた。

【考察】

定型的検査では発見困難、かつ耐性復帰可能な VanB 型 VAN 感受性腸球菌が国内に潜在的に存在し拡がっている可能性がある。

## β-ラクタム系薬の選択圧の違いがB群レンサ球菌のβ-ラクタム系薬低感受性化へ及ぼす影響

小出将太<sup>1</sup>, 小坂駿介<sup>1</sup>, 谷口唯<sup>1</sup>, 林航<sup>1</sup>, 大崎裕介<sup>1</sup>, 木村幸司<sup>2</sup>, 長野由紀子<sup>2</sup>  
荒川宜親<sup>2</sup>, 長野則之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科, <sup>2</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】我々はこれまでにB群レンサ球菌感染症治療の第一選択薬であるペニシリンに低感受性 (MIC $\geq$ 0.25  $\mu$ g/mL)を示す株 (PRGBS)やペニシリン感受性でセフトラキムに耐性を示す株 (CTB'PSGBS)を報告してきた。今回, 各種  $\beta$ -ラクタム系薬の選択圧の違いが PRGBS や CTB'PSGBS の選択に及ぼす影響を *in vitro* 実験により解析した。

【方法】新生児髄膜炎由来血清型 III ST17 株 (MICs; PCG 0.06  $\mu$ g/mL, セフトラキム [CTX] 0.12  $\mu$ g/mL, CTB 32 $\mu$ g/mL)を用いた。Stepwise 法は PCG, CTX, CTB の各希釈系列で継代培養, sublethal 法は各薬剤の 1/2 MIC 濃度で 50 回継代培養を実施した。さらに抗菌薬非含有培地で 10 回継代し耐性の安定性を評価した。また, コロニーの観察及び薬剤感受性試験を実施し, *pbp2x*, *2b*, *1a* の塩基配列からアミノ酸配列を推定した。

【結果・考察】Stepwise 法の場合 PCG 選択株では 19 継代以降の株で PCG の MIC が 0.25-0.5  $\mu$ g/mL と安定的に維持され正常コロニーの PRGBS が選択された。これらの株は PBP2X に PRGBS のキー置換 V405A に隣接した G406D を共有していた。CTX の MIC は 0.25-0.5  $\mu$ g/mL と上昇し, CTB の MIC は  $>$ 512  $\mu$ g/mL と高値であった。CTX 選択株では 5 から 20 継代までの株で CTX の MIC が 0.5 $\mu$ g/mL と上昇し, PBP2X に G398E を有する PRGBS が選択された。さらに CTX の MIC が 1 から 2  $\mu$ g/mL と非感性になった場合 G398E に加えて G329V, H438Y が認められたものの, いずれの株も  $\gamma$ 溶血の微小コロニーを呈した。これらの株は 10 回継代後には正常コロニー及び置換前のアミノ酸配列に復帰すると共に MIC の低下が認められた。しかし, 28 継代目の株の MIC の低下は非感性の 1  $\mu$ g/mL であった。これらの知見から, CTX の MIC が 1  $\mu$ g/mL 以上では GBS の viability が低下することが考えられ, これは PRGBS 臨床分離株の CTX の MIC の限界値が 1  $\mu$ g/mL であることと矛盾しない。CTB 選択株では早期の 2 継代目に CTB の MIC が 64  $\mu$ g/mL に上昇し, PBP2X に T555S が認められた。その後も MIC は安定的に上昇し, 256  $\mu$ g/mL の株で A354V, 512  $\mu$ g/mL の株で A536V が蓄積していき CTB'PSGBS が選択された。特に T555S は PRGBS のキー置換 Q557E よりも KSG motif に隣接していたが, CTB 選択株では PCG の MIC は 0.06-0.12  $\mu$ g/mL の範囲にとどまり, PRGBS には進展しなかった点が注目される。Sublethal 法の場合いずれの薬剤でも PRGBS は選択されなかった。

本報では stepwise 法, sublethal 法いずれでも *pbp2b* と *pbp1a* には安定的な変異は認められなかったことから,  $\beta$ -ラクタム系薬の存在下では *pbp2x* が感受性の低下に主要な役割を果たしていることが示唆された。PRGBS は海外と比較し国内で多く検出され, 特に高齢者の呼吸器材料から高頻度に分離されるが, 現時点で新生児病原性クローンである ST17 株を含め新生児侵襲性感染症由来株では確認されていない。今回の実験は新生児髄膜炎由来 ST17 株を用いたが, *in vitro* ではあるものの  $\beta$ -ラクタム系薬の選択圧下では PRGBS が出現したことから, 抗菌薬適正使用の重要性が示唆される。

## グラム陰性桿菌におけるホスホマイシン分解酵素 FosA の検索と新規阻害薬の探索

Yohei Doi,<sup>1,2</sup> Ryota Ito,<sup>2</sup> Adam Tomich,<sup>1</sup> Nicolas Sluis-Cremer<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>ピッツバーグ大学医学部感染症内科学・<sup>2</sup>藤田保健衛生大学医学部微生物学)

### 背景

グラム陰性桿菌の多剤耐性化の進行により、細胞壁合成阻害薬のホスホマイシンが再び注目されている。ホスホマイシンは大腸菌に対して極めて高い抗菌力を示すが、他のグラム陰性桿菌に対する抗菌力は MIC 値で 3 から 5 管程度劣る場合が多い。これらの菌種は染色体性にホスホマイシン分解酵素遺伝子 *fosA* を保有していることが経験的に知られているが、その分布や機能については不明な点が多い。

### 方法

- 代表的なグラム陰性桿菌 18 種の 18,130 ゲノムを対象に *fosA* 様遺伝子を閾値 40% で検索した。
- このうち 8 菌種の *fosA* をクローニングし、ホスホマイシンの MIC を測定した。
- Serratia marcescens* K904 株の *fosA* を欠損させ、ホスホマイシンの MIC を測定した。
- Klebsiella pneumoniae* の *fosA* およびプラスミド性 *fosA3* の結晶構造を決定した。
- FosA の競争的阻害薬であるホスカルネットによる FosA の阻害定数を決定し、FosA 産生菌のホスホマイシン MIC および時間殺菌曲線に対するホスカルネットの阻害効果を測定した。
- 市販のスクリーニングライブラリーより FosA の新規競争的阻害薬を同定し、機能を解析した。

### 結果

-*P. stuartii*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca*, *M. morgani*, *P. rettgeri*, *E. cloacae* の各菌種では 82.4-100% のゲノムが *fosA* を保有していた。一方、*P. mirabilis*, *S. enterica*, *A. pittii*, *E. coli*, *C. freundii*, *A. baumannii*, *A. xylosoxidans*, *B. cepacia*, *S. maltophilia* では *fosA* 保有率は 0-16.7% だった。*S. marcescens* の FosA 欠損株では MIC が 16 mg/L から 0.5 mg/L に低下した。また、FosA 発現クローン全てで MIC が上昇した (1 mg/L から 16->1024 mg/L)。

-*K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* の FosA およびプラスミド性 FosA3 の活性部位の構造はほぼ同一だった。一方、二量体が結合するループ構造の長さには違いが見られたことから、これが FosA 活性に反映されている可能性が示唆された。

-*K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* の FosA およびプラスミド性 FosA3 はホスカルネットにより競争的に阻害された ( $K_i$  値 = 22.6-56.3  $\mu$ M)。また、用いた FosA 産生臨床株 61 株中 29 株で、ホスカルネット 667  $\mu$ M 添加によりホスホマイシンの MIC 値が 2 管以上低下した。

-市販のスクリーニングライブラリー 5040 化合物の FosA 阻害能をスクリーニングしたところ、3 化合物で用量依存的な FosA 阻害が見られた。このうち、最も有力なヒットである Inhibitor X はホスカルネットを大きく上回る FosA 阻害能を示した ( $K_i$  = 0.9  $\mu$ M)。Inhibitor X を 26  $\mu$ M 添加することにより FosA 産生臨床株のホスホマイシン MIC 値を 2 管程度下げることができた。

### 結語

一連の研究により、グラム陰性桿菌の FosA を阻害することによりホスホマイシンを賦活化できる可能性が示された。

## 国内の種々材料由来腸内細菌科細菌におけるコリスチン耐性機序の多様性

林航<sup>1</sup>, 谷口唯<sup>1</sup>, 大崎裕介<sup>1</sup>, 小出将太<sup>1</sup>, 小坂駿介<sup>1</sup>, 長野由紀子<sup>2</sup>, 荒川宜親<sup>2</sup>, 長野則之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科, <sup>2</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】コリスチン (CL)は多剤耐性グラム陰性桿菌感染症の最後の砦的抗菌薬であるが、現在国内外でCL耐性菌の出現が大きな問題となってきた。本報ではヒト臨床材料、市販鶏肉及び愛玩動物臨床材料由来のESBL産生*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*で確認されたCL耐性株を対象に耐性機序の分子学的解析を試みた。

【方法】千葉県の高齢患者留置カテーテル尿由来Ec1 (CL MIC 16 µg/mL)、長野県の小児便由来Ec2 (CL MIC 16 µg/mL)及び市販鶏肉由来Ec3 (CL MIC 8 µg/mL)の*E. coli* 3株、イヌカテーテル尿由来*K. pneumoniae* Kp1 (CL MIC 64 µg/mL)1株を対象にESBL遺伝子の同定、MLST、プラスミド性CL耐性因子*mcr-1*, -2, -3の検出及びLPS生合成に関わる二成分制御系*pmrA/pmrB*, *phoP/phoQ*とその負制御因子*mgrB*遺伝子の解析を行った。また、*E. coli*のO25b型別、系統群別、H30の判定、Ec1とEc2については*bla*<sub>CTX-M</sub>遺伝子の周辺構造解析を行った。

【結果】ヒト臨床材料由来株の保有ESBL遺伝子はEc1が*bla*<sub>CTX-M-15</sub>、Ec2が*bla*<sub>CTX-M-27</sub>と同定され、いずれの株もB2系統群のO25b-ST131-H30クローンに属していた。また、Ec1とEc2は*mcr-1*, -2, -3が陰性であったが、PmrAにブタ下痢症由来CL耐性株で報告されているN128I及びS144G, PhoQにH6Rのアミノ酸置換を共有し、PhoP遺伝子に同義的置換を共有していた。しかしながら、PmrBにEc1ではG19R, Ec2ではA158Vが確認され、いずれも新規なアミノ酸置換であった。*bla*<sub>CTX-M</sub>遺伝子の周辺構造は、Ec1が*ISEcp1-bla*<sub>CTX-M-15-orf477</sub>, Ec2が*IS26-ΔISEcp1-bla*<sub>CTX-M-27-ΔIS903D-IS26</sub>といずれもヒト流行クローンO25b-ST131-H30の保有プラスミドで多く報告されているものであった。

松本市内の市販国産鶏肉由来*bla*<sub>CTX-M-1</sub>保有Ec3 (ST1684)では*mcr-1*が確認された。この*mcr-1*は*bla*<sub>CTX-M-1</sub>を担うIncl1プラスミドとは別のIncl2プラスミド上に存在し、構造遺伝子内に1塩基変異の同義的置換が認められた。周辺構造*nikB-mcr-1-pap2-ydfA-topB*は、2015年に中国のブタ糞便由来*E. coli* strain JS-61の保有するIncl2プラスミド上の相応配列と99%一致していた。また、PmrAにヒト臨床由来Ec1, Ec2で検出されたS144Gのアミノ酸置換が認められた<sup>1)</sup>。

愛玩動物からはCLに加え、CL同様最後の砦となるチゲサイクリン (TGC)にも耐性を示す(TGC MIC 8 µg/mL) Kp1が確認された。この株は*bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>DHA-1</sub>同時保有のヒト流行クローンST37と同定された。さらに*armA*, *fosA3*, *qnrB*を保有し、GyrAとParCにそれぞれS83IとS80Iのアミノ酸置換を有する広範囲抗菌薬耐性株であった。本株は*mcr-1*, -2, -3陰性であったが、*mgrB*への*IS10*の挿入により構造遺伝子が破壊されることでCL耐性を獲得したと考えられる。一方、AcrAB-TolC多剤排出ポンプの負の制御因子遺伝子*ramR*が同じく*ΔIS10*の挿入により破壊されることでこの排出ポンプの過剰発現がおこりTGC耐性を示すことが示唆される<sup>2)</sup>。

【考察】CLの選択圧下にはない患者や愛玩動物に由来するヒト流行クローンの*E. coli* B2-O25b-ST131-H30や*K. pneumoniae* ST37にCL耐性株が確認されたことから、これらの耐性株の国内での伝播・拡散に注意が必要である。さらには、市販食肉よりプラスミド性*mcr-1*が検出されたことは、公衆衛生上最も懸念すべきことであり、ヒトやヒトを取り巻く様々な環境においてCL耐性株の監視の強化が重要であると考えられる。

<sup>1)</sup> Jpn J Infect Dis. 2017 Sep 25;70(5):590-592.

<sup>2)</sup> Int J Antimicrob Agents. 2017 Sep 21. pii: S0924-8579(17)30351-5.

## グラム陰性菌多剤排出トランスポーター複合体の構成と構造

林克彦 1), 中島良介 2), 櫻井啓介 2), 西野-林美都子 1), 山崎聖司 1), 北川公恵 2), 山口明人 2), 西野邦彦 1)

大阪大学・産業科学研究所・生体分子制御科学研究分野 1)

大阪大学・産業科学研究所・生体防御学研究分野 2)

【背景】グラム陰性菌には多くの薬剤排出トランスポーターが存在し、これらのトランスポーターが抗生物質を認識して菌体外へ排出する機構が存在する。これらの薬剤排出トランスポーターは抗生物質への主な自然抵抗性を担い、大量発現により多剤耐性化を引き起こす。トランスポーターは内膜に存在して気質を能動的に排出する。大腸菌では AcrB が、緑膿菌では MexB、MexY が主要であり、これらは RND(Resistance Nodulation-cell Division)型トランスポーターに属する。RND 型多剤排出トランスポーターは、内膜にアンカーされたアダプター蛋白質および外膜チャネルと複合体を構成し、菌体外へと基質薬剤を排出するという特徴を持つ。

【目的】RND 型多剤排出トランスポーター複合体構造はクライオ電子顕微鏡を用いた複数例の報告がある。この構造はアダプター蛋白質 AcrA を介して、AcrB と外膜チャネル TolC が 5nm 離れた構造をしているが、一方で菌体内では AcrB と TolC が直接の相互作用をしているという報告があり、複合体が必要な排出機構の全容解明のために、AcrB と TolC が直に結合した「短い」複合体構造の解析を試みている。

【結果】長い複合体では 6 分子の AcrA が筒状を構成し、TolC の下端と結合している。短い複合体では AcrB と TolC が直に接しているため、3 分子の AcrA で十分と考えられる。そこで、この構成比を検証すべく、1:1 の構成比で融合した AcrB-AcrA 融合蛋白質を作製した。AcrB は強固な 3 量体として機能するため、複合体構成中の AcrA の数は 3 つに限定される。AcrB-AcrA 融合蛋白質は膜に発現し、発現量を制御して排出活性を測定すると、それ単独で抗生物質を排出し、多剤耐性を持つことが明らかとなった。このことから、3 分子の AcrA で機能する短い複合体の存在が示唆された。実際にこの短い三者複合体と思われる粒子像を透過型電子顕微鏡のネガティブ染色像によって得ている。

この短い複合体が排出活性を有するかどうかを検証するため、AcrB と構造が同じ MexB と MexY は、それぞれ MexA、MexX と異なるアダプター蛋白質を使い、同じ外膜チャネル OprM を使用することを利用した。MexB の薬剤認識部位をドメインごと MexY と入れ替えた MexB-MexY キメラ蛋白質、および 3 つある各ドメインを入れ替えた 4 種の MexA-MexX キメラ蛋白質を組み合わせ、排出活性測定を通じてアダプター蛋白質とトランスポーターの相互作用関係を調べた。その結果、蛋白質構造が報告された長い複合体では最上部のドメインでのみ相互作用をしていたが、MexB-MexY キメラと MexA-MexX キメラでは薬剤認識部位を含むドメインでの対応関係でも認識でも排出活性が保持されていた。

これらのことから、多剤排出トランスポーターの複合体構造はグラム陰性菌のペリプラズムの厚みに対応する長短の複合体が存在し、効率よく排出を行なっているものと考えられる。



## 鶏肉検体からの ESBL、AmpC 産生腸内細菌科細菌の分離と解析

○大竹洋輔<sup>1</sup>、千葉菜穂子<sup>1</sup>、久留島潤<sup>1</sup>、谷本弘一<sup>2</sup>、富田治芳<sup>1,2</sup>

群馬大・院医・細菌学<sup>1</sup>、

群馬大・院医・薬剤耐性菌実験施設<sup>2</sup>

【背景】 近年、ESBL や AmpC 型セファロスポリナーゼを産生する薬剤耐性菌が医療分野で問題となっている。また、これらの  $\beta$ -lactamase を産生する薬剤耐性菌は畜産分野においても高頻度に検出され問題となっている。抗菌薬の家畜への投与により家畜腸管内で選択的に増加したそれらの耐性菌が食肉などの畜産物を介してヒトに伝播・拡散することも危惧されている。本研究では国内外から収集した鶏肉から ESBL や AmpC 型  $\beta$ -lactamase を産生する腸内細菌科細菌を分離し、 $\beta$ -lactamase 遺伝子の検出と型別を行った。またそれら薬剤耐性の伝達性を調べた。

【方法】 昨年収集した 226 検体(国内 150 検体と国外 76 検体)、今年収集した 198 検体(国内 110 検体と国外 88 検体)の鶏肉検体を ABPC 40  $\mu$ g/mL 含有 LB broth で培養後、培養液を CTX もしくは CAZ 1  $\mu$ g/mL 含有 DHL 寒天培地に 100  $\mu$ L 塗布し CTX 耐性株と CAZ 耐性株を 2 株ずつ、1 検体につき計 4 株を選択した。ESBL 産生はクラブラン酸による CTX もしくは CAZ の MIC 値低下から、AmpC 産生はボロン酸による CFX の MIC 値の低下から判定した。 $\beta$ -lactamase 遺伝子の型別を PCR で行った。菌種同定は DHL 寒天上でのコロニー性状、同定キット(BBL Crtstal E/NF)、16S rDNA 配列決定法により行った。ESBL あるいは AmpC 遺伝子を保有していた株について固形培地上での接合伝達実験を行い、薬剤耐性の伝達を調べた。

【結果】 **国内 260 検体** ESBL 産生株は 91 検体 (35.0% ; 昨年 8 検体、今年 83 検体) から 115 株 (昨年 9 株、今年 106 株) 検出された。AmpC 産生株は 67 検体 (25.8% ; 昨年 30 検体、今年 37 検体) から 71 株 (昨年 31 株、今年 40 株) 検出された。また ESBL と AmpC をともに産生する株が 7 検体 (2.7% ; 昨年 2 検体、今年 5 検体) から 7 株検出された。検出された菌のほとんどが *E. coli* であり、*K. pneumoniae* が 1 株、サルモネラ属菌も少数検出された。

**国外 164 検体** ESBL 産生株は 35 検体(21.3% ; 昨年 19 検体、今年 16 検体)から 41 株(昨年 24 株、今年 17 株)検出された。AmpC 産生株は 12 検体(7.3% ; 昨年 3 検体、今年 9 検体)から 12 株(昨年 3 株、今年 9 株)検出された。また ESBL と AmpC をともに産生する株が 1 検体(0.6% ; 昨年 1 検体)から 1 株検出された。検出された菌のほとんどが *E. coli* であり、*E. cloacae*、サルモネラ属菌が 1 株ずつ検出された。

**遺伝子型別** ESBL は CTX-M 型が最も多く(昨年 : 国内 66.7%、国外 83.3%、今年 : 国内 83.2%、国外 100%)、特に CTX-M-2 group が多く検出された(昨年 : 国内 50%、国外 64.7%、今年 : 国内 70.3%、国外 64.7%)。昨年の国外 6 株(35.3%)から CTX-M-8/25 group が検出された。AmpC はすべてが CIT 型であった。ESBL、AmpC 両保有株はすべてが TEM と CIT の組み合わせであった。

**接合伝達実験** ESBL あるいは AmpC 遺伝子を保有していた株のうち、昨年 70 株中 40 株(57%)、今年 83 株中 45 株(54%)で耐性の伝達が観察された。

【考察】 国内、国外ともに鶏肉検体から高頻度に ESBL または AmpC 産生菌が検出され、これらがヒトに伝播することが危惧される。それらの ESBL、AmpC 耐性遺伝子の多くが伝達性を示したことから他の腸内細菌科細菌に速やかに拡散し、耐性化させる可能性がある。また検出される遺伝子型は収集期間や国内か国外かによって異なるため、今後も継続的に動向を把握していくことが重要である。

## 市販鶏肉由来 ESBL 産生 *Escherichia coli* の遺伝学的特性

大崎裕介<sup>1</sup>, 林航<sup>1</sup>, 谷口唯<sup>1</sup>, 小出将太<sup>1</sup>, 小坂駿介<sup>1</sup>, 長野由紀子<sup>2</sup>  
荒川宜親<sup>2</sup>, 長野則之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科, <sup>2</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】ESBL 産生 *Escherichia coli* のヒト腸管内保菌の増加の一因に食肉の摂取による伝播経路が示唆されている。本研究では食肉における ESBL 産生 *E. coli* の検出状況やそれらの分子学的特性解析によりヒト由来 ESBL 株との関連性を調べた。

【方法】2015 年 8 月～2016 年 6 月に長野県で収集した種々の部位の市販鶏肉 150 検体及び豚肉 50 検体を対象に増菌培養後 CTX 添加 McConkey 寒天培地で発育した 3 コロニーについて酵素阻害試験, MALDI-TOF MS による菌種同定, ESBL 遺伝子の PCR スクリーニングを行なった。ESBL 遺伝子の塩基配列解析, 系統群解析, MLST を実施した。さらに *bla*<sub>CTX-M</sub> の周辺構造を解析し, GenBank 登録配列との周辺構造の比較を行なった。

【結果】鶏肉 150 検体のうち ESBL 産生 *E. coli* は 59 検体 (39.3%) から検出された。特にブラジル産の鶏肉では 10 検体中 8 検体 (80.0%) と高率であった。一方, 豚肉 50 検体からは ESBL 産生 *E. coli* は検出されなかった。同一検体中遺伝子型の異なる 70 株の ESBL 遺伝子解析の結果, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> が 17 株 (24.3%) と最も多く, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> が 16 株 (22.9%), *bla*<sub>SHV-12</sub> が 11 株 (15.7%), *bla*<sub>CTX-M-55</sub> が 10 株 (14.3%) 検出された。系統群解析では B1 群が 18 株 (27.7%) で, そのうち *bla*<sub>CTX-M-14</sub> が 9 株 (50.0%) と優位であった。B2 群は 3 株と少数であったが, その姉妹群にあたる F 群が 17 株 (24.3%) 検出され, そのうち *bla*<sub>CTX-M-14</sub> と *bla*<sub>CTX-M-55</sub> が各々 5 株を占めていた。MLST 解析の結果 ST は多様であったが, 産生する酵素型により特定のクローンへの集積が認められた。すなわち *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 保有株では ST162, *bla*<sub>SHV-12</sub> 保有株では ST38 が特徴的であった。ヒト世界流行クローンである ST131 は検出されなかった。また, *bla*<sub>CTX-M-55</sub> 保有株ではヒト由来 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 保有株にて地域的な拡散の報告がある ST1485 も認められた。鶏肉由来株の *bla*<sub>CTX-M</sub> の多くがヒト由来株と同じ周辺構造を有し同一のクラスターを形成していた。*bla*<sub>CTX-M-14</sub> ではヒト臨床由来株にて最も多く認められた *ISEcp1-bla*<sub>CTX-M-14-ΔIS903</sub> が 4 株検出された。また, *ISEcp1* に IS5 が挿入した配列は鶏肉由来株のみで検出され独立の遺伝系統を形成していた。さらに, 5 株で *IS26-ΔISEcp1-bla*<sub>CTX-M-14-ΔIS903-fosA3</sub> が認められた。*bla*<sub>CTX-M-55</sub> では *ISEcp1* とのスペーサーは 45 bp であった。

【考察】ヒト由来株で高頻度に検出される *bla*<sub>CTX-M-14</sub> については, 鶏肉由来株でも高頻度に検出され, なかでもヒト定着株に多い B1 系統群が優位であった。同様にヒト由来株に多い *bla*<sub>CTX-M-15</sub> は鶏肉由来株では検出されなかったが, 1 アミノ酸違い (A80V) の *bla*<sub>CTX-M-55</sub> が多く検出された。*ISEcp1* と *bla*<sub>CTX-M-15</sub> とのスペーサーは 48 bp の報告が多く, *bla*<sub>CTX-M-55</sub> では 45 bp のものと 48 bp のものが確認されている。鶏肉由来 *bla*<sub>CTX-M-55</sub> 株の場合 45 bp のみが認められたことからこのスペーサー配列長を持つ周辺構造が家畜を起源としている可能性も考えられる。本報の鶏肉由来株ではヒト由来株と共通する特定のクローンは認められなかったが, *bla*<sub>CTX-M</sub> 周辺構造の比較解析では鶏肉由来株の多くはヒト由来株と同一のクラスターに分類されたことから, 耐性を担うプラスミドやトランスポゾンなどの可動性遺伝因子がヒトと家畜の間で循環している可能性が示唆される。

## 健常人および鶏肉間における CTX-M-8 ESBL 遺伝子の水平伝播は IncII/ST113 により媒介される

○法月千尋<sup>1,2</sup>、和知野純一<sup>3</sup>、鈴木匡弘<sup>4</sup>、川村久美子<sup>1</sup>、荒川宜親<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科 医療技術学専攻、<sup>2</sup>公立陶生病院 臨床検査部

<sup>3</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科 分子病原細菌学、<sup>4</sup>藤田保健衛生大学 医学部  
微生物学講座)

【目的】基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase, ESBL)産生大腸菌のヒトでの拡散が大きな懸念事項となっており、その一因として食肉からの伝播が疑われている。本研究では、健常人糞便由来および市販鶏肉由来の CTX-M-8 型 ESBL 産生大腸菌の染色体 DNA およびプラスミド DNA を、次世代シーケンサーにて解析することにより、ヒトと鶏肉の間での遺伝子の水平伝播の可能性について考察することを目的とする。

【材料・方法】健常人糞便由来 CTX-M-8 型 ESBL 産生大腸菌 6 株、ブラジル産鶏肉由来株 8 株を対象とした。各菌株のゲノム DNA およびプラスミド DNA を各々抽出し、次世代シーケンサー Miseq (Illumina, Inc., CA, USA)にて全塩基配列を解析した。得られたデータの解析では、アセンブルは A5-miseq pipeline、multilocus sequence typing (MLST)解析は MLST 1.8. server、プラスミドレプリコンタイプの決定は PlasmidFinder 1.3 を各々使用した。また、*bla*<sub>CTX-M-8</sub> を保有するプラスミドのサイズは、S1 nuclease を用いた pulsed-field gel electrophoresis にて決定した。

【結果・考察】CTX-M-8 型 ESBL 産生大腸菌 14 株のゲノム DNA における MLST 解析では、12 種の異なる ST 型に分類され、菌株の遺伝的背景が異なることが示唆された。一方、プラスミド DNA の解析では、*bla*<sub>CTX-M-8</sub> はいずれも 82 から 105 kb の IncII プラスミド上に存在していること、さらに健常人糞便由来 6 株中 3 株と鶏肉由来株 8 株中 6 株の IncII プラスミドが共に ST113 に分類されることが明らかとなった。そこで、健常人糞便由来株が保有する IncII/ST113 プラスミド(pHU23)と鶏肉由来株が保有する IncII/ST113 プラスミド(pCH11)の比較解析をおこなったところ、両者はそれぞれ 91,831 bp と 101,377 bp、coverage 97%、identity 99%となり、両プラスミドの構造が極めて類似していることが明らかとなった。以上の結果から、CTX-M-8 型 ESBL 産生大腸菌の拡散は、大腸菌の特定のクローンによるものではなく、*bla*<sub>CTX-M-8</sub> を保有する IncII/ST113 プラスミドが水平伝播することにより生じた可能性が大きいことが示唆された。なお本研究の主な成果は Antimicrob Agents Chemother. 2017. 24;61(6)に掲載された。

## 愛玩動物臨床由来セフトキシム耐性 *Enterobacteriaceae* における CTX-M-27 ESBL 産生 *E. coli* B2-O25b-ST131-H30R クローンの高頻度分布

谷口唯<sup>1</sup>, 林 航<sup>1</sup>, 大崎裕介<sup>1</sup>, 小出将太<sup>1</sup>, 小坂駿介<sup>1</sup>, 前山佳彦<sup>1,2</sup>, 玉井清子<sup>2</sup>, 長野由紀子<sup>3</sup>  
荒川宜親<sup>3</sup>, 長野則之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>信州大学大学院 医学系研究科, <sup>2</sup>ミロクメディカルラボラトリー

<sup>3</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】AMR 対策アクションプランに掲げられている愛玩動物由来薬剤耐性菌に関する知見は未だ不十分である。今回、愛玩動物の臨床材料由来セフトキシム(CTX)耐性株の疫学調査及び分子学的特性解析を行った。

【方法】2016年5月～9月に全国の動物病院より収集した愛玩動物の臨床材料由来CTX耐性 *Enterobacteriaceae* を対象とした。AmpC β-lactamase 及びESBL産生性の表現型試験による推定, β-lactamase 遺伝子その他各種耐性遺伝子の同定, MLST解析を行った。*Escherichia coli* についてはO25/O86a血清型別, O25b型別, H30の判定, 系統発生群解析及び主な定着遺伝子を検索した。また, *bla*<sub>CTX-M</sub>保有株について遺伝子の周辺構造解析を行った。

【結果】CTX耐性株は *E. coli* で381株中81株(21.3%), *Klebsiella pneumoniae* で50株中21株(42%), *Proteus mirabilis* で56株中2株(3.6%)と, *K. pneumoniae* で高率であった。*E. coli* 81株のうち *bla*<sub>CTX-M-27</sub> が16株, *bla*<sub>CMY-2</sub> が15株, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> が14株, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> が10株で検出された。*K. pneumoniae* 21株のうち *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> が各4株, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> が3株であったが, *E. coli* で多く検出された *bla*<sub>CTX-M-27</sub> は検出されなかった。また, 21株中7株がヒト流行クローンST15と同定されたが, 保有する *bla* 遺伝子は多様であった。*P. mirabilis* 2株は *bla*<sub>CTX-M-2</sub> 保有株であった。その他 *E. coli* で *fosA3* が2株, *K. pneumoniae* で *armA* が1株, *armA*+*fosA3* が1株から検出された。*E. coli* 81株の系統発生群別ではB2が42株, 次いでFが16株と多かったが, 特にB2に属するO25b-ST131クローン24株のうち22株がH30Rサブクローンと同定された。さらにこれら22株のうち13株が *bla*<sub>CTX-M-27</sub> 保有株, 5株が *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 保有株であり, 愛玩動物においても *bla*<sub>CTX-M-27</sub> 保有ヒト病原性世界流行クローンの優位性が確認された。一方, *bla*<sub>CTX-M-27</sub> 保有 *E. coli* 16株中13株がB2-O25b-ST131-H30Rであり, それ以外の *bla*<sub>CTX-M-27</sub> 保有クローン3株とは異なる共通の周辺構造を有していた。すなわち流行クローンの場合IS26-ΔISEcp1 (208 bp)-*bla*<sub>CTX-M-27</sub>-ΔIS903D-IS26であったのに対し, それ以外のクローンの場合IS26-ΔISEcp1 (388 bp)-*bla*<sub>CTX-M-27</sub>-IS903Dであった。

【考察】Matsumuraらは国内におけるESBL産生ヒト腸管外病原性 *E. coli* の増加が2010年以降の *bla*<sub>CTX-M-27</sub> 保有 *E. coli* ST131-H30R クロンの増加に起因していることを報告している。本報でも *bla*<sub>CTX-M-27</sub> 保有 B2-O25b-ST131-H30R クロンの優位性が見いだされ, ヒト-愛玩動物間の薬剤耐性菌の循環を裏付ける知見となった。さらに愛玩動物が薬剤耐性菌のreservoirとなり得る可能性が示唆され, ヒトのみならず, 愛玩動物も対象としたAMR対策が重要と考えられる。

## 大腸菌由来 CTX-M 型 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子保有プラスミドの系統ネットワーク解析

○鈴木匡弘<sup>1,2</sup>、和知野純一<sup>3</sup>、川村久美子<sup>4</sup>、長野則之<sup>5</sup>、荒川宜親<sup>3</sup>

<sup>1</sup>藤田保衛大・医・微生物、<sup>2</sup>愛知衛研・細菌、<sup>3</sup>名大・医・細菌学、

<sup>4</sup>名大・保健・細菌学、<sup>5</sup>信州大・保健・細菌学

【目的】プラスミドは共通に保存された配列がない、頻繁に組み換えが起こるなどの理由から、系統解析は困難で pMLST や 1 対 1 の比較に限られてくる。一方、基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在することが多く、ESBL 遺伝子保有プラスミドの系統を解明することは、耐性遺伝子の拡散原因を解明する上で重要である。そこで本研究では、系統ネットワークを作成することでプラスミドを系統解析し ESBL 遺伝子保有プラスミドの近縁関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト及びその他の家禽・家畜由来検体から分離した大腸菌由来 IncI1 プラスミド 65 個及び IncF プラスミド 28 個を、MiSeq で塩基配列を解析した。併せて NCBI データベースからダウンロードした incI1 プラスミドデータ 57 個及び IncF プラスミド 80 個を用いた。IncI1 プラスミドのうち 95 個、IncF プラスミドのうち 52 個は何らかの CTX-M 型  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を保有していた。加えて、IncI1 のプラスミドデータについては pMLST 解析を行った。系統ネットワーク解析にはプラスミドを構成する ORF のパターンを 1, 0 で表したバイナリーシーケンスを用いた。ドラフトシーケンスの ORF 予測には prodigal (Bioinformatics, 2012 28:2223-30) を、ORF 有無の判定には blastn を使い、独自に作成した python スクリプトを用いてバイナリーシーケンスを作成した。

【結果】IncI1 プラスミドでは、CTX-M-1 保有 1 プラスミドは近縁な関係にあり、特に ST3 のものは極めて近縁であった。また、CTX-M-8 保有プラスミドについては全て近縁な関係にあり特に ST113 のプラスミドは極めて近い関係にあった。一方 CTX-M-15 保有プラスミドについては系統ネットワーク上で比較的近縁な 2 系統に分かれ、それぞれ主に ST16 及び ST31 に分類されたものが主であった。CTX-M-14 保有プラスミドについても主に 2 系統に分かれ、それぞれ ST80 及び 4-2-10-3-3 に分類されるものが主であった。

他方 IncF プラスミドについては CTX-M-27 保有プラスミドは多くが近縁関係にあった。CTX-M-14 および CTX-M-15 保有プラスミドはそれぞれ系統ネットワーク上で比較的近い位置に来るがものが多かったが、近縁関係が見られないものもあった。

【考察】同一の CTX-M 型  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を保有する、incI1 プラスミドはホストの大腸菌の系統に因らず、クローナルに伝播していることが示唆された。一方、IncF プラスミドについては、IncI1 に比べ、同一 CTX-M 型保有プラスミド間においてもやや多様性が高い傾向があり、組み換え頻度が高い可能性を示した。系統ネットワーク解析は pMLST の結果との相関も良く、プラスミドの系統を良く反映した解析が可能と考えられた。特定の遺伝子の存在に依存しないため、pMLST 解析できないプラスミドについても解析可能であり、プラスミド間の近縁関係が明確になると考えられた。

## 在宅医療患者および介護施設入所者等における 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生大腸菌の保菌率と分子疫学解析

- 林 謙吾<sup>1</sup>、川村久美子<sup>1</sup>、北岡一樹<sup>2</sup>、木村幸司<sup>2</sup>、和知野純一<sup>2</sup>、飯沼由嗣<sup>3</sup>、  
村上啓雄<sup>4</sup>、藤本修平<sup>5</sup>、荒川宜親<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>名大院・医・医療技術、<sup>2</sup>名大院・医・細菌、<sup>3</sup>金沢医大・臨床感染症学、<sup>4</sup>岐阜大・  
医・附属病院・生体支援センター、<sup>5</sup>東海大・医・生体防御学)

【目的】国内において在宅医療を受けている高齢者や介護施設入所者においても、基質特異性拡張型β-lactamase (ESBL)産生大腸菌を保菌している可能性が推定されているが、その実態は殆ど明らかになっていない。そこで本研究では、それらを明らかにすることを目的とし、在宅医療患者および介護施設入所者における ESBL 産生大腸菌の保菌率と、その分子疫学解析を行った。

【方法】2015年11月から2017年3月にかけて、関東、東海、北陸地区の9施設において、同意が得られた356名から咽頭拭い液(279検体)、尿(235検体)および糞便(258検体)を採取し、クロモアガーESBL(関東化学)にて分離培養を行った。分離された菌株についてVitek MSによる菌名同定を行い、ESBL産生大腸菌であると確認された菌株について、ESBL遺伝子型、系統発生群、multilocus sequence typing (MLST)解析によるクローン解析、plasmid replicon type、O血清型、線毛抗原の決定ならびに12薬剤についてCLSI(M100-S25)に準拠した寒天平板希釈法による薬剤感受性試験を実施した。

【結果】咽頭拭い液1検体(0.3%)、尿27検体(11.5%)、糞便62検体(24.0%)からESBL産生大腸菌90株が分離された。主なESBL遺伝子型はCTX-M-27、CTX-M-14、CTX-M-15であり、TEM-型やSHV-型は1株も検出されなかった。MLST解析の結果、ST38、ST131、ST405、ST1193、ST4891の5種類が検出され、その内ST131が75株(83.3%)と最も優位であった。さらに、ST131株は全てが系統発生群B2に属し、68株がO25b、72株が線毛抗原H30であった。以上の解析結果から、90株のうち68株(75.6%)が世界的pandemic clone B2-O25b-ST131-H30に分類されることが明らかとなった。また、plasmid replicon typeの解析では、90株中53株で形質転換体を得られ、IncF groupが42株と優位であった。薬剤感受性傾向はカルバペネム系、アミノ配糖体系抗菌薬やホスホマイシンに対し高い感受性を示したが、シプロフロキサシンに対しては88.9%が耐性を示した。

【考察】本調査により、在宅医療患者および介護施設入所者においても一定の割合でESBL産生大腸菌を保菌しており、その過半数がpandemic cloneであることが明らかになった。しかしながら、在宅医療や高齢者施設で検出される菌株と病院環境で検出される菌株の分子疫学的特徴を比較検討するには、今回の調査では菌株数が十分ではないこと、さらには在宅医療患者および介護施設入所者等の中での層別も必要であるが、現状では十分な情報が得られていないことなどから、更なる調査研究が必要であると考えられる。

# β-lactamase 産生 *Capnocytophaga* 属菌における

## CSP 型 β-lactamase 遺伝子の保有状況

高橋 啓<sup>1</sup>、 松本 竹久<sup>2</sup>

<sup>1</sup>群馬大学 医学部保健学科、<sup>2</sup>群馬大学大学院保健学研究科

### 【目的】

*Capnocytophaga* 属菌はヒトを含む動物の口腔内常在細菌である。近年、歯周病との関連や、免疫不全患者における血流感染などの感染症例の報告がなされている。また 2010 年には *C. sputigena* から ESBL である CSP 型 β-lactamase ( $bla_{csp}$ ) が同定されたが、現在までに *Capnocytophaga* 属菌における  $bla_{csp}$  の保有状況について調べた報告はない。そこで私たちは β-lactamase 産生 *Capnocytophaga* 属菌の臨床分離株を対象として  $bla_{csp}$  の保有状況を調べた。

### 【材料と方法】

対象菌株は、臨床材料から分離され、cefinaise disc により β-lactamase 産生が陽性と判定された *Capnocytophaga* 属菌 (*C. sputigena* 29 株, *C. gingivalis* 10 株, *C. leadbetteri* 5 株, *Capnocytophaga* sp. 4 株) の計 48 株とした。 $bla_{csp}$  の保有はサザンハイブリダイゼーションで確認し、既報の primer (H. Guillon et al., AAC 2010) と新たに設計した primer の 2 種類を用いて PCR による検出を確認した。

### 【結果および考察】

β-lactamase 産生 *Capnocytophaga* 属菌の  $bla_{csp}$  の保有率は 68.8% (33/48) [*C. sputigena* 79% (23/29), *C. gingivalis* 80% (8/10), *C. leadbetteri* 0% (0/5), *Capnocytophaga* sp. 50% (2/4)] であった。 $bla_{csp}$  を同定した Guillon らが設計した primer による  $bla_{csp}$  検出用 PCR では菌種にかかわらず非特異的な増幅が生じた。一方、新たに設計した  $bla_{csp}$  検出用 primer による PCR では、特異的な増幅が確認でき、サザンハイブリダイゼーションの結果と一致した。Guillon らは、β-lactamase 産生・非産生の *C. sputigena* にかかわらず PCR にて  $bla_{csp}$  を検出したことから、 $bla_{csp}$  は *C. sputigena* の染色体性の β-lactamase であると報告している。しかし、本検討では  $bla_{csp}$  を保有さない *C. sputigena* が存在したことや、*Capnocytophaga* 属の菌種にかかわらず保有を確認することができた。本検討から  $bla_{csp}$  は何らかの機構により伝達され移動している可能性が考えられた。

## 「耐性菌関連電子システム開発の現状」

### － 耐性菌条件/警告・案内定義メッセージの標準化・RICSS・2DCM-web の進捗 －

藤本修平<sup>1)</sup>、谷本弘一<sup>2)</sup>、富田治芳<sup>2)</sup>、八木哲也<sup>3)</sup>、柴山恵吾<sup>4)</sup>、荒川宜親<sup>3)</sup>、村上啓雄<sup>5)</sup>

1) 東海大学, 2) 群馬大学, 3) 名古屋大学, 4) 国立感染症研究所, 5) 岐阜大学

耐性菌による院内感染症対策には、菌の院内拡散の抑制、抗菌薬の適正使用による耐性菌選択圧の抑制が重要であり、科学的な対策実施のために根拠となるサーベイランスによるデータが必要である。私たちは、これを効率的、高精度に行うために電子化を進めてきた。最近の進捗を報告する。

#### 【耐性菌条件/警告・案内定義メッセージ】

検査機器、検査機器に接続されたデータ管理装置に読み込ませ、耐性菌の条件、および、その耐性菌が検出されたときに、警告と同時に表示するその後取るべき手順などの表示内容を定義するファイルである。耐性菌の水際での対策の標準化に役立つものであるが、耐性菌の定義を行う標準化したメッセージ(ファイル)としても利用できる。後者の機能を利用して、2DCM-web において、特定の耐性菌だけを表示、あるいは CRE のように複数菌種にわたる耐性菌を表示させるのにすでに利用されている。作成のためのツールは、群馬大学[2DCM-web 実習システム]\*の HP で公開、試用中である。試用終了後、JANIS に移す予定である。検査機器メーカーに対する説明会も開催する予定である。

#### 【RICSS】

診療報酬加算にもとづく感染対策の地域連携を支援し、さらに、全国レベルまでの自由なグループ形成、全国レベルでの感染対策の実施状況とそのアウトカムに関する情報の収集、集計、還元を可能にしたシステムである。平成 28 年度に AMED からの資金で開発を行った。

平成 29 年度から厚生労働省の委託事業として国立国際医療研究センター内に設けられた AMR 臨床レファレンスセンターに移管され改良作業が行われている。現在約 70 施設が試行を継続している。今後、自由なグループ形成機能を活用して、耐性菌、院内感染に対するより幅広いサーベイランスのプラットフォームとして活用すること、集計データを簡単に選択表示させる機能を行かして AMR に関す

るさまざまな情報を統合的に還元するためのプラットフォームとして利用することを予定している。RICSS には、確率計算の方法を簡便化し PMA (Probability-based Microbial Alert) と同様の結果を得ることができる PMAL とそれにもとづく、 $\Sigma$  alert matrix が実装されており院内での菌の異常拡散の検出とその原因の推測を支援する。

#### 【2DCM-web】

2DCM-web に対して、以下 3 点の改良を行った。1) 前述の「耐性菌条件/警告・案内定義メッセージ」を利用して、複数菌種、特定の耐性菌を選択して表示できるようにした。2) 従来の配色に加えて、同一マップ中でより耐性度の高い株に赤などの目立つ色を割り当てる機能を加えた。3) 操作パネルをサブウィンドウ化し、動かす、消す、拡張ディスプレイに表示させることができるようにした。

2DCM-web の普及のために、感染症関連学会のご協力の下に、2DCM-web 実習 WS を開催してきた。平成 28 年度 WS の成果を、[2DCM-web 実習システム]\*として、群馬大学文部科学省特別プロジェクト成果ページの中から利用できるようにした。

2DCM は耐性菌を絞り込むことによって複数施設の分離菌のデータを解析し耐性菌の地域拡散を分析することが可能であるが、施設間(機種間)に存在する MIC 測定値の偏差の解消が精度の高い解析に必要である。また、現在、JANIS の CSV 還元情報では SIR 判定値のみで MIC 値の還元を行っていない。MIC 値を利用することで 2DCM の精度は向上する。MIC 値の CSV ファイルでの還元を期待している。

耐性菌関連の電子システムは一定の進歩を遂げているが、現存の技術で十分に解消できる課題も多く残っており、今後も研究開発とともに改良、実装を続ける必要がある。

\* [2DCM-web 実習システム]HP の URL  
<http://yakutai.dept.med.gunma-u.ac.jp/project/2dcm/index.html>



## サブクラス B3 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ SMB-1 の阻害剤探索

○金地玲生、和知野純一、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・耐性菌制御学)

### 【目的】

近年、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ（以下 MBL）を産生し、カルバペネム耐性となった腸内細菌科細菌（以下 CRE）の拡散が、医療現場で問題となっている。WHO は 2017 年に「対策の緊急性が高い耐性菌リスト」を公表しており、その中でも、広範囲多剤耐性を示す CRE には有効性が期待できる抗菌薬が極めて限られているため、CRE は最も緊急性が高い耐性菌のグループに指定されている。このような状況から、CRE 感染症の患者予後を改善する為に、新規抗菌薬や MBL 阻害剤の開発が急務となっている。

我々の研究グループは、*Serratia marcescens* が外来性に獲得したサブクラス B3 に属する MBL である SMB-1 を世界で最初に発見し研究を進めてきた。その一環として、SMB-1 を標的とした阻害剤の開発を目的として研究を進めている。現在は、阻害剤の骨格となる化合物の探索を実施しており、その進捗状況について報告する。

### 【方法】

FDA 既承認薬や Analyticon 等の 4 つの化合物ライブラリーを対象に、10-100  $\mu$ M 程度の濃度で SMB-1 のニトロセフィン分解反応を阻害する活性を測定することで、阻害物質の探索を行った。選抜された酵素活性阻害物質については、SMB-1 産生菌を用いて、メロペネムの MIC の低下を指標として阻害活性を評価した。

### 【結果】

スクリーニングした全 7,203 化合物中、ニトロセフィン分解活性を 30%以下まで減弱させる化合物が 144 (2.0%) 種類得られた。その中で、SMB-1 産生菌に対し、100  $\mu$ g/ml で毒性（増殖抑制効果）を示さず、メロペネムの MIC を 1/8 以下に低下させた化合物を 9 (0.1%) 種類得ることができた。

### 【考察】

特定の構造を持つ化合物が SMB-1 の活性を阻害する傾向が見られた。多くはチオール基等の既知の MBL 阻害に関連する官能基を有する化合物であった。しかし、構造からは阻害様式が予想し難い化合物も阻害剤候補として選択されてきた。今後、X 線結晶構造解析により、SMB-1 との結合様式を特定していくと同時に、阻害作用（酵素への結合親和性やグラム陰性菌の外膜透過性）を更に高める為の構造改変を進める計画である。

### 【参考文献】

1. Wachino J, et al., AAC. 2016, 60 (7):4274-82.
2. Wachino J, et al., AAC. 2013, 57 (1):101-9.
3. Wachino J, et al., Acta Crystal Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2012, 68:343-6.
4. Wachino J, et al., AAC. 2011, 55(11):5143-9.

## 新規メタロ-β-ラクタマーゼ阻害化合物等の探索と開発へのチャレンジ

○荒川宜親<sup>1</sup>、和知野純一<sup>1</sup>、木村幸司<sup>1</sup>、佐藤綾人<sup>2</sup>、黒崎博雅<sup>3</sup>、金 万春<sup>1</sup>、

Anupriya Kumar<sup>1</sup>、金山堯人<sup>1</sup>、金地玲生<sup>1</sup>、坂野弘嗣<sup>1</sup>、北岡一樹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>名古屋大・院・医 分子病原細菌学/耐性菌制御学、<sup>2</sup>名古屋大・トランスフォーマティブ生命分子研究所 ITbM・ケミカルライブラリーセンター、<sup>3</sup>金城学院大・薬・機器分析学/薬品分析学)

【背景と目的】2010年以降、カルバペネム系のみならずフルオロキノロン系やアミノ配糖体系などに対し広範な耐性を獲得した、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)、さらにCREなどの感染症の治療において有効性が期待できるコリスチンに耐性を付与するMCR-1(ホスホエターノールアミンをLPSに付加する酵素)などをプラスミド依存性に産生する大腸菌などが、世界各地で分離されるようになり、臨床現場で大きな現実的脅威となっている。そのため、先の伊勢志摩サミットでも薬剤耐性(Antimicrobial resistance: AMR)問題が国際的に協同して取り組むべき主要な緊急課題の一つとして取り上げられ、各国でAMR対策のための様々な取り組みが開始されている。

このような事態を踏まえ、当教室では、AMEDの支援を受けて名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(ITbM)の佐藤綾人准教授や金城学院大学薬学部の黒崎博雅教授らと連携し、細菌学、化学、薬学の3分野の専門家で学術的知識や研究技術を提供しあい、CRE等の新型の広範囲多剤耐性菌に有効性が期待される新規物質等の探索等を進めた。

【方法】具体的には、カルバペネマーゼの中で最も一般的かつ多様なタイプが出現しているメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)の活性を阻害する物質を、ITbMの所有する20,000種類以上の天然物由来化合物ライブラリーとともに市販の化合物ライブラリーの中から選択し、酵素化学的阻害パラメーターの測定とともに阻害物質との共結晶の作成とX線結晶構造解析による結合状態の解明、さらにSchrödingerなどの専用解析ソフトを用いたトッキング・シミュレーション解析などを行っている。これらにより得られたデータに基づいて、より強い阻害活性を有する分子への構造改変なども試みた。

【結果と考察】23,250種のITbM化合物ライブラリーの中からMBLに対して阻害活性を有する33種類の化合物を選択した。その中で、IMP型やNDM型などのMBLに対して強い阻害活性(IMP-1に対するIC<sub>50</sub>は0.22 μM)を示す分子量が約300の化合物Aを発見した。IMP-1産生大腸菌などを用い、メロペネム等のカルバペネム薬共存下で化合物Aを数μg/mlの濃度で共存させることで、カルバペネムのMICが4-6管程度低下するなどの結果が得られている。さらに、化合物AとMBLとの共結晶のX線結晶構造解析により、活性中心への化合物Aの詳しい結合状態を解明しつつある。同時に、化合物Aの類縁体や誘導體などを複数入手あるいは新規に合成し、それらの阻害活性パラメーターの測定やドッキング・シミュレーションなども実施中である。

一方、市販の化合物ライブラリーについても、MBL等に対して阻害活性を有する物質の探索を行い、精製したMBL酵素に対して、強い阻害活性を示す阻害物質Bなどを選択することができた。しかし、阻害物質Bは、精製したMBLに対しては強い阻害活性を示すものの、MBL産生大腸菌株を用いた実験では、メロペネムなどの共存下で阻害活性がはっきり観察できない。おそらく、MBL分子が機能するグラム陰性菌のペリプラズムに到達し難いなどのメカニズムが関係しているものと推定されたため、細菌に取り込まれやすくなるような化学構造の修飾改変などを試みている。

【まとめ】IMP-1やNDM-1を産生する大腸菌株において強い阻害活性を示す阻害物質A等を発見した。さらに精製したMBLに対しては強い阻害活性を示すものの、生菌を用いた阻害実験では、十分な阻害現象が観察されない阻害物質B等の複数の化合物を見出した。同時にX線結晶構造解析などの手法を用いて、酵素への結合状態の解明および分子改変の可能性の検討などを進めている。今後は、MBL酵素への結合親和性がより高くかつグラム陰性菌に取り込まれやすい化学構造を有する阻害物質の作成を目指して研究を進める計画である。

## 東日本で検出されたカルバペネム耐性大腸菌の遺伝子解析結果

○小川美保、坂田竜二、市村禎宏

株式会社ビー・エム・エル 細菌検査部

【はじめに】カルバペネム系薬は、グラム陰性菌感染症に対し広い抗菌スペクトラムを有し、 $\beta$ -ラクタマーゼに安定であり、さらに、細胞外膜の浸透性が高い薬剤であるため、重症および難治性感染症患者に対し使用されている重要な薬剤である。今回我々は、東日本から分離されたカルバペネム耐性大腸菌について、その耐性機構、伝播状況を明らかにするため調査を行った。

【対象および方法】2016年7月から2017年7月までに東日本から分離され、VITEK-2にてCREと判定された大腸菌13株を対象とした。薬剤感受性は、MEPM, IPM, PIPC, PIPC/TAZ, CMZ, CAZ, LVFX, AMK, について微量液体板希釈法にて測定した。耐性遺伝子の検出には、次世代シーケンサーMiSeqを用いて塩基配列を決定した。得られたゲノム情報に対しResFinderを用いて耐性遺伝子の型別を行った。

【結果】遺伝子解析の結果、測定した13株中5株がIMP-1を保有していた。CTX-M-2産生が1株、CTX-M-15産生株が4株、CTX-M-27産生株が5株、TEM-1産生株が5株、OXA-1産生株が4株検出された。キノロン耐性については、aac(6')Ib-cr産生株が3株、qnrA7産生株が2株、qnrA6産生株が1株検出された。 $\beta$ -lactamaseについてはIMP-1単独産生株が2株であった。この2株は同時にキノロン耐性のqnrA6とqnrA7をそれぞれ産生していた。IMP-1とCTX-M-2とTEM-1同時産生株、IMP-1とTEM-1同時産生株、IMP-1とCTX-M-27同時産生株がそれぞれ1株ずつ検出された。同時に複数の $\beta$ -lactamaseを産生していた株は10株であった。

【考察】今回調査したカルバペネム耐性大腸菌13株は、IMP-1産生株であり関西方面で多く検出されているIMP-6産生株およびIMP-6と同時にCTX-M-35産生株は検出されなかった。このことから、関西方面で多く分布しているカルバペネム耐性大腸菌と、東日本で分布しているカルバペネム耐性大腸菌は保有しているプラスミドが異なることが考えられた。

ネパールの医療施設で分離されたカルバペネム耐性大腸菌の分子疫学解析

○多田達哉<sup>1</sup>・Basudha Shrestha<sup>2</sup>・島田佳世<sup>3</sup>・Jeevan B. Sherchand<sup>2</sup>・菱沼知美<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>トリブバン大学医学部微生物学

<sup>3</sup>国立国際医療研究センター研究所感染症制御研究部

**【背景】**カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (*Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*) が地球規模で医療安全を脅かしている (WHO, 2016)。我々はネパールのトリブバン大学医学部微生物学教室および同大学医学部附属教育病院との共同研究を2012年から実施してきた。本発表では同大学医学部附属教育病院から分離されたカルバペネム耐性大腸菌の分子疫学解析を行った。

**【方法】**全 250 株の大腸菌の薬剤感受性試験を実施し、カルバペネム耐性 (イミペネムまたはメロペネムの MIC が > 4ug/ml) の大腸菌 38 株をスクリーニングした。ゲノムを抽出し、次世代シーケンサを用いた全ゲノム解析を実施した。系統樹解析は完全長ゲノムが決定している大腸菌 ST2747 (accession no. CP007394) をリファレンスに SNP コンカテマーを作成した。系統樹は最尤法により解析した。

**【結果および考察】**38 株のカルバペネム耐性大腸菌は全株 NDM 産生菌であった。NDM のタイピングを行ったところ、NDM-1 (16 株)、NDM-3 (1 株)、NDM-4 (1 株)、NDM-5 (11 株)、NDM-7 (7 株)、NDM-12 (1 株)、NDM-13 (1 株) と様々な NDM バリエントが同定された。さらに 38 株中、33 株がアミノグリコシド高度耐性を示す多剤耐性で 16S rRNA メチラーゼ産生菌であった。16S rRNA メチラーゼ産生菌は ArmA 産生菌 (14 株)、RmtB 産生菌 (11 株)、RmtC 産生菌 (4 株)、ArmA-RmtB 共産生菌 (2 株)、ArmA-RmtC 共産生菌 (2 株) であった。MLST 解析の結果、ST38 (3 株)、ST94 (1 株)、ST101 (6 株)、ST167 (5 株)、ST361 (2 株)、ST405 (8 株)、ST448 (3 株)、ST648 (5 株)、ST2083 (2 株)、ST2659 (1 株) および ST4108 (2 株) といった様々な ST に属する菌が同定された。分子系統解析の結果、これらの菌は大きく分けて 3 つのグループに大別された。グループ A には ST38、ST405 および ST2659、グループ B には ST94、ST101、ST167、ST361、ST448、ST2083 および ST4108、グループ C には ST648 に属する菌が分類された。

ネパールの医療施設で分離されたカルバペネム耐性大腸菌の分子疫学解析は今までほとんどなされていない。本研究によりネパールの医療施設ではどのようなカルバペネム耐性大腸菌が新興しているのかが明らかとなった。2015 年、国立国際医療研究センターのグループが市中感染における大腸菌の調査を実施し、ネパールでは ST131 および ST648 に属する菌が主な原因菌であることが分かっている。本研究の結果、グループ C に属する ST648 大腸菌が院内感染起因菌としても分離されており、市中感染の起因菌が院内に移行し、カルバペネム耐性およびアミノグリコシド耐性を獲得したことが示唆された。

広島県で分離された多剤耐性*Acinetobacter*が保有する  
GES-24プラスミドの解析

鹿山鎮男<sup>1,2</sup>、矢野雷太<sup>1,2,3</sup>、久恒順三<sup>1,2</sup>、山下明史<sup>4</sup>、黒田誠<sup>4</sup>、鈴木仁人<sup>5</sup>、矢原耕史<sup>5</sup>、鈴木里和<sup>5</sup>、柴山恵吾<sup>5</sup>、大毛宏喜<sup>1,6</sup>、菅井基行<sup>1,2</sup>

- 1) 広島大学院内感染プロジェクトセンター
- 2) 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 細菌学
- 3) 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 外科学
- 4) 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
- 5) 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター
- 6) 広島大学病院 感染症科

私どもはこれまでに、広島県内の医療施設から分離された多剤耐性*Acinetobacter spp* MS5394株より、GES-4と1アミノ酸 (K104E) 異なるβ-ラクタマーゼを見出し、GES-24と名付けて報告した。GES-type β-ラクタマーゼはAmbler class Aに属し、本来はESBLに分類されるが、GES-24はカルバペネマーゼ活性を持つ。S1 Nucleaseを用いたPFGEから $bla_{GES-24}$ はプラスミド上に存在することが明らかとなった。そこで、次世代シーケンサーMiSeq (Illumina社) を用いてプラスミド塩基配列を決定したところ、 $bla_{GES-24}$ は $bla_{IMP-1}$ 、aminoglycoside (6)'-*N*-acetyltransferase遺伝子とともにインテグロン上に存在していることが明らかにされた。そこで、Oxford Nanopore Technologies社 MinIONを用いて配列決定を行い、Canu v1.5を用いて*de novo* assemblyを実施した。次にCirclatorにより環状化し、さらにPilonにてIlluminaデータを用いて補正を行ったところ、完全長プラスミド配列 (153kb) が得られた。このプラスミドはマレーシアで分離された*Acinetobacter pittii* AP\_882株が保有する二つのプラスミドpNDM-1とpOXA-58が融合した配列であることが明らかになった。潜在的にGES-24を保有する菌が存在することが明らかになったことを受け、カルバペネマーゼ型GES保有の有無を迅速に検査する手法の必要性が高まった。そこで、ARMS-PCR法を用いて、カルバペネマーゼ型GESをPCRにて特異的に検出する系を構築したので併せて紹介する。

## *Acinetobacter baumannii* の接合伝達における VI 型分泌機構の影響

吉田 真歩<sup>1,2</sup>、平林 亜希<sup>2</sup>、荒川 宜親<sup>1</sup>、柴山 恵吾<sup>2</sup>、鈴木 仁人<sup>2</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学/耐性菌制御学研究室

<sup>2</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性菌研究センター

### 要旨

薬剤耐性 (AMR) のアシネトバクター属菌などの病原細菌は、国境を越えて伝播し、AMR 問題は人類の重大な脅威となっている。カルバペネム耐性遺伝子のような重要な獲得性 AMR 遺伝子は、しばしばプラスミドの接合伝達を介して細菌間で拡散するため、継続的な監視が重要である。本研究では、*Acinetobacter baumannii* (Ab)の国内分離多剤耐性流行株において、カルバペネム耐性遺伝子を有する伝達性プラスミドを同定し、その拡散機構を検討した。

国内で分離された Ab の多剤耐性流行株 MRY12-0277 株において、Illumina 社、PacBio 社および Oxford Nanopore Technologies 社の次世代シーケンサーによる DNA 配列の解読を行い、染色体とプラスミドを BLAST にて検索し、ACT にて配列比較を行った。同株と種々の Ab 分離株を混合培養し、接合伝達と細菌間競合の状況を観察した。

Ab MRY12-277 株は 77.5kb のプラスミド上にカルバペネム耐性に関わる *bla*<sub>OXA-23</sub> 遺伝子を有し、同プラスミドは中国分離 Ab 株の伝達性プラスミドと極めて高い相同性を示した。同流行株と他の流行株との混合培養において、同プラスミドの接合伝達が観察された。しかし、同流行株と非流行株との混合培養においては、レシピエントである非流行株の菌数が激減し、接合伝達がほとんど起こらなかった。この細菌間競合の主要な要因と考えられた VI 型分泌機構の構成遺伝子を欠損させた流行株を作製し、混合培養を行った結果、流行株と非流行株間の細菌競合の影響が低下し、効率的な接合伝達が観察された。現在、Ab 流行株において、VI 型分泌機構を介して分泌される抗菌性タンパク質の機能を解析中である。

## 核酸クロマトを用いたカルバペネマーゼ遺伝子検出キットの有用性評価

田寺加代子<sup>1,2</sup>、鹿山鎮男<sup>1,2</sup>、池田光泰<sup>1,2</sup>、原稔典<sup>1,2</sup>、黒尾優太<sup>1,2</sup>、宮本重彦<sup>3</sup>、直原啓明<sup>3</sup>、菅井基行<sup>1,2</sup>

- 1) 広島大学 院内感染プロジェクトセンター
- 2) 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 細菌学
- 3) 株式会社カネカ Medical Devices Solutions Vehicle

**【目的】** 臨床検体の薬剤耐性遺伝子の検出にはPCR法が用いられているが、これには二つの欠点がある。一つはPCR反応後の電気泳動に多くの時間と労力を要すること、今一つは多種の耐性遺伝子を同時に効率よくスクリーニングするため、プライマーをmultiplex化したために一部のバンドが不鮮明になることや、サイズ判定が煩雑となることである。このようなmultiplex-PCR反応後の検出系にまつわる問題点を解決する目的で、核酸クロマトの原理をベースとした検出方法を利用したキットについて、その有用性を検討することにした。

**【方法】** 株式会社カネカにて開発中の「薬剤耐性(カルバペネマーゼ)遺伝子検出キット(仮称)」を用いた。このキットには、検出可能なカルバペネマーゼとしてOXA-48、NDM、IMP、VIM、KPCが含まれる。菌培養液の加熱上清を用いてPCRを実施し、反応終了後の溶液に展開バッファを添加後、テストストリップを挿入して10分後に検出ラインを目視で確認した。

**【結果と考察】** 様々なカルバペネマーゼ遺伝子を保有する菌株50株を用いて検討したところ、培養液の加熱上清を用いたPCR反応では感度と特異度は共に100%であり、検出ラインの視認性も良好であった。当日の発表では、様々なDNA抽出方法を用いて感度・特異度について比較検討した結果を述べる予定である。

## 地方衛生研究所のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌検査を迅速化する マルチプレックス PCR 法の開発

○綿引正則<sup>1</sup>、鈴木匡弘<sup>2</sup>、熊谷優子<sup>3</sup>、松本裕子<sup>4</sup>、範本志保<sup>1</sup>、野田万希子<sup>5</sup>、河原隆二<sup>6</sup>、増田加奈子<sup>7</sup>、仙波敬子<sup>8</sup>、福田千恵美<sup>9</sup>、原田誠也<sup>10</sup>、松井真理<sup>11</sup>、鈴木里和<sup>11</sup>、鈴木仁人<sup>11</sup>、柴山恵吾<sup>11</sup>、四宮博人<sup>8</sup>

<sup>1</sup>富山県衛生研究所・細菌部、<sup>2</sup>愛知県衛生研究所・生物学部\*、<sup>3</sup>秋田県健康環境センター・保健衛生部、<sup>4</sup>横浜市衛生研究所・微生物検査研究課、<sup>5</sup>岐阜県保健環境研究所・保健科学部、<sup>6</sup>大阪健康安全基盤研究所・微生物部、<sup>7</sup>広島県立総合技術研究所・保健環境センター、<sup>8</sup>愛媛県立衛生環境研究所・衛生研究課、<sup>9</sup>香川県環境保健研究センター・微生物細菌、<sup>10</sup>熊本県保健環境科学研究所・微生物科学部、<sup>11</sup>国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター

【目的】カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)の増加が世界的に問題となっている。特にカルバペネマーゼ(CPase)産生菌はプラスミド上にその遺伝子が存在し、菌種を超えて伝播するため注意が必要である。また、世界的にはCPase 遺伝子は、北米ではKPC型、欧州ではOXA-48型、本邦ではIMP型が主に検出される地域性があり、世界的に人の移動が活発な現在、既に海外由来と思われるCPase 遺伝子が国内でも報告されている。そこで、平成29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(健感発0328第4号)」の通知が発出され、地方衛生研究所(地研)において、感染症発生動向調査事業として検査体制の整備が必要となってきた。

CPase 産生腸内細菌科細菌(CPE)の鑑別は、従来の薬剤感受性試験だけでは困難であり、PCRによる遺伝子検査が最も確実な方法である。世界的に検出例が多いプラスミド性CPase 遺伝子として、IMP、VIM、NDM、KPC、および一部のOXA-48とGES型が知られており、亜型を含めると検査対象のCPase 遺伝子は多数となり、効率的なスクリーニング方法が望まれていた。そこで今回、6種のCPase型を同時にスクリーニング可能とするマルチプレックスPCR(mPCR)を開発したので報告する。

【方法】プライマーの設計に必要なCPase 遺伝子の配列はDDBJより取得し、1チューブでmPCRを可能とする合計14本のプライマーを設計した。KPC、NDM、VIM、OXA-48及びGES型については、2本のプライマーをそれぞれ使い、増幅サイズをそれぞれ322 bp、207 bp、155 bp、125 bp及び94 bpとし、IMP型については4本のプライマーを用い、増幅サイズを269 bpとした。PCR試薬には、QIAGEN Multiplex PCR Plus Kitを用いた。mPCRの検証には、CPE株として7属9種の56株、non-CPE株として8属12種の93株、およびグルコース非発酵菌7株の臨床分離株を用いた。

【結果及び考察】既にCPE及びnon-CPEとして鑑別された臨床分離株を用いたmPCRの結果、予想通りのCPase 遺伝子を示すサイズの増幅物がほぼ一本検出された。プライマーの設計上検出できるCPase 遺伝子は、KPC、NDM、OXA-48及びGES型では、現在までに報告されている全ての亜型、また、多くの亜型が報告されているIMP及びVIM型では、それぞれ報告数のうち検出される遺伝子は44/53及び36/39となる。IMP及びVIM型には一部検出できない亜型が存在し、本邦ではきわめて稀なタイプである。また、OXA-48およびGES型については、スクリーニング効率を重視したことにより、CPase 活性を持たない亜型も検出されるが、その場合には追加試験にて塩基配列を決定し、サブタイプを確認することが必要となる。現時点では、菌株の入手困難等の理由で、今回開発したmPCRについて、検出可能な全ての遺伝子の検証は不可能であった。しかし、本邦で検出されるCPEをほぼ網羅しており、地研が実施する迅速なCREの詳細検査として有用な方法であると考えられた。

(\*現 藤田保健衛生大学医学部・微生物学講座)



## Drug Susceptibility Testing Microfluidic device (DSTM)を用いた血液培養陽性検体の迅速感受性検査法の検討

○坂田 竜二<sup>1)</sup>、小川 美保<sup>1)</sup>、市村 禎宏<sup>1)</sup>、霜島 正浩<sup>1)</sup>、松本 佳巳<sup>2)3)</sup>

1)株式会社ビー・エム・エル 細菌検査部

2)株式会社フコク

3)大阪大学 産業科学研究所

【目的】耐性菌の増加に伴い、抗菌薬適正使用の為、起炎菌の感受性検査の迅速化が求められているが、血液培養陽性検体の検査は、特に迅速性が必要なものの一つと考えられる。大阪大学で考案され(株)フコクで開発中のマイクロデバイスと顕微鏡を用いる DSTM (Drug Susceptibility Testing Microfluidic device)法を用いて、血液培養陽性検体から直接感受性を簡易測定する方法を検討したので報告する。

【方法】当日の朝に培養陽性となり、グラム染色および MALDI-TOFMS の結果から、ブドウ球菌(4 検体)またはグラム陰性桿菌(10 検体)が推定された計 14 検体を用いた。DSTM チップは、ブドウ球菌には MRSA スクリーニング用チップを、グラム陰性桿菌には、 $\beta$ -lactamase スクリーニング用チップを用いた。検体の前処理として、培養陽性になったボトルから検体を 1mL マイクロチューブにとり、卓上小型遠心機 (2,000 g、ミリポア) で 30 sec 遠心して血球成分を分離した。以降の処理は 2 通りの方法で実施した。**方法 1:** 上清を新しいチューブに移し、TOMY MX-200 (トミー精工) で 10,000 g、5 min 遠心した沈渣を 2 mL の MH-broth に懸濁し、濁度を測定した。McF: 0.5 を超えたものは、MH-broth で希釈して McF 0.4 ~ 0.5 に調製した。McF: 0.4 より薄かったものはなかった。**方法 2:** 上清を 0.2 mL 試験管に取り、1.8 mL の MH-broth を加えて 1 時間振盪培養した後濁度を測定し、McF: 0.3 以上あれば、McF 0.3 ~ 0.5 に濁度調製して使用した。

【結果】血液培養陽性検体は、上記 2 種の方法のいずれでも顕微鏡観察の邪魔になる成分をほぼ除くことができた。今回用いた 14 検体の中で CNS と推定された 1 検体が 2 の方法で McF 0.31 と推奨濁度下限に近かった以外は、いずれの方法でも全て McF 0.4 以上の濁度の菌液が得られ、直接 DSTM 法に用いることで、前処理時間を含めて 4 時間以内に全検体の結果を得ることができた。2 の方法は培養時間が 1 時間長くなるものの高速遠心が不要というメリットに加え、菌の感受性が高まり、より判定しやすくなる傾向もみられた。用いたグラム陰性桿菌 10 検体のうち 2 検体で DSTM 法により ESBL の産生が陽性と判定され、バイテック 2 による耐性パターンの結果と一致していた。ブドウ球菌の検体でも DSTM 法で得られた感受性の結果は、2 日後に得られたバイテック 2 による結果と概ね一致していた。

【考察】簡単な前処理をした血液培養陽性検体は、直接 DSTM 法にかけて ESBL 産生やメチシリン耐性を検査することができた。培養陽性となったその日のうちに感受性の結果を得ることができる DSTM 法は、MALDI-TOF-MS に併用する迅速感受性検査法として有用であり、さらなる適応菌種の拡大が望まれる。

## MAIDI-TOF MSデータを用いた

### バンコマイシン低感受性 MRSA株の自動判別

朝倉弘太<sup>1)</sup>、畦地拓哉<sup>1)</sup>、笹野央<sup>1)</sup>、松井秀仁<sup>2)</sup>、花木秀明<sup>2)</sup>、宮崎元康<sup>3)</sup>、高田徹<sup>4)</sup>、関根美和<sup>5)</sup>、高久智生<sup>6)</sup>、落合友則<sup>6)</sup>、小松則夫<sup>6)</sup>、柴山恵吾<sup>7)</sup>、片山由紀<sup>5)</sup>、○矢原耕史<sup>7)</sup>

<sup>1)</sup>順天堂大学医学部附属順天堂医院 薬剤部、<sup>2)</sup>北里大学北里生命科学研究 感染制御研究センター、<sup>3)</sup>福岡大学筑紫病院 薬剤部、<sup>4)</sup>福岡大学病院 感染制御部、<sup>5)</sup>順天堂大学 医学部・微生物学講座、<sup>6)</sup>順天堂大学 医学部・血液学講座、<sup>7)</sup>国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター

【背景】VCM 中間耐性黄色ブドウ球菌(VISA)は、 $MIC_{VCM} \geq 4 \mu\text{g/mL}$  (CLSI) を示す株と定義される。しかし、 $MIC_{VCM} < 4 \mu\text{g/mL}$  を示すにもかかわらず  $1 \times 10^{-7}$  以上の頻度で VCM  $4 \mu\text{g/mL}$  の耐性菌が出現する場合があります、その状態・表現型は heterogeneous VISA (hVISA) と呼ばれる。hVISA は、その MIC 値から VCM 感受性と判定されるが、耐性化細胞が内在する細胞集団のため、VCM 等の暴露により VCM 感受性黄色ブドウ球菌(VSSA)よりも VISA が出現しやすい。それゆえ hVISA は VCM 治療の奏功しない要因の一つと考えられ、迅速で簡便な検査・検出法の開発が重要である。その検出にはこれまで、PAP/AUC 法が用いられてきたが、煩雑で労力を必要とする方法であり、細菌検査室での実施は不可能であった。より簡便な方法として近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)を用いた VSSA と hVISA の判別手法が提案されたが (Mather et al 2016, JCM)、精度は 76%に留まり、実験手技の記載も十分でなかった。本研究では、より高感度に VCM 低感受性株を判別できる手法・実験手技を検討した。

【材料と方法】1987 年から 2008 年に国内 13 医療施設から分離された血液培養液由来 MRSA 96 株と、hVISA 標準株 Mu3、合計 97 菌株を用いた(1 菌株から複数個のコロニーを採取した場合があります、合計 139 コロニーを用いた)。Bruker 社推奨のエタノール抽出法がサンプル調整を行い、MALDI-TOF MS によりスペクトルデータを得た。また寒天培地による hVISA スクリーニング法で hVISA 表現型を確認した。

【結果と考察】VSSA/hVISAの判別に有用なスペクトル位置の組み合わせを探索し自動判別を行うコンピュータプログラムを開発した。その結果、hVISAを100%の感度で判別可能であった(特異度は90%であった)。また、MALDI-TOF MSのサンプル調整には、Bruker社推奨のエタノール抽出法が有効であることが分かった。このプログラムに基づき、簡単なマウス操作でMALDI-TOF MS のデータを入力しhVISAの自動判別ができる、all-in-one (インストーラ不要) のグラフィカルなソフトウェアも開発し、公開した([https://github.com/bioprospects/hVISAc\\_classifier](https://github.com/bioprospects/hVISAc_classifier))。このプログラムは汎用的なものであり、VSSA/hVISA以外の自動判別にも応用可能である。今後、本手法・プログラムが細菌検査室を含め広く活用されていくことが期待される。

## 携帯型実験機器を用いたアジア新興国現地での薬剤耐性菌のゲノム疫学解析

平林 亜希<sup>1</sup>、柳沢 英二<sup>2</sup>、高橋 宏瑞<sup>3</sup>、矢原 耕史<sup>1</sup>、柴山 恵吾<sup>1</sup>、鈴木 仁人<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>株式会社マイクロスカイラボ

<sup>3</sup>順天堂大学医学部 総合診療科

【背景】 近年急速に医療の発展を遂げているカンボジアは、カルバペネム耐性菌による感染症が数多く報告されているベトナム、タイなどと国境を接しているが、現在までに同感染症の詳細な疫学調査および起因菌の遺伝学的解析に関して報告がほとんど存在しない。本研究では、同国でのカルバペネム耐性菌の実態の一端を明らかにするため、現地の研究機関に最新の携帯型実験機器を持ち込み、臨床分離株のゲノム疫学解析を共同で行った。

【方法】 カンボジア・国立公衆衛生研究所にて収集された mCIM 陽性の *Acinetobacter baumannii* 1 株 (株 1) と *Escherichia coli* 2 株 (株 2 および 3) などを解析対象とした。SMA またはクラブラン酸を用いたダブルディスク法、および PCR 法にてβ-ラクタマーゼの産生性を検討した。Etest 法を用いて、薬剤感受性試験を行った。PCR サーマルサイクラー、遠心機、電気泳動装置の機能を 1 台で有する携帯型複合型実験機器である Bento Lab (Bento Bioworks 社) を用いて、PCR 法による耐性遺伝子の検出を行った。CRE の主要なカルバペネマーゼ遺伝子 (IMP 型、VIM 型、OXA-48 型、NDM 型、KPC 型)、およびアシネトバクター属菌の主要なカルバペネマーゼ遺伝子 (OXA-23、OXA-24、OXA-58) を PCR の標的とした。携帯型シークエンサーである MinION (Oxford Nanopore Technologies 社) を用いて、プラスミドを含む完全ゲノムの解析を行った。全ての実験は現地で行った。

【結果および考察】 *A. baumannii* 株 1 は、SMA ディスク法にて陰性、PCR 法にて OXA-23 が陽性で、感受性試験は IPM、MEPM とともに MIC 値 >32 μg/mL (R) と高かった。*E. coli* 株 2 は、SMA ディスク法にて陽性、PCR 法にて NDM 型が陽性、感受性試験は IPM、MEPM とともに MIC 値 2 μg/mL (I) であった。*E. coli* 株 3 は、SMA ディスク法にて陰性、PCR 法にて OXA-48 型が陽性、感受性試験は IPM、MEPM の MIC 値はそれぞれ 0.38 μg/mL (S)、0.25 μg/mL (S) であった。完全ゲノムの構築に基づいたゲノム疫学解析では、菌株の遺伝型、耐性遺伝子の型別、および耐性遺伝子を保有しているプラスミドの型別とその由来を推測することができ、5 泊 6 日滞在の最終日に現地の研究者と情報共有を行った。

Bento Lab や MinION などの携帯型実験機器は、実験を行う場所を選ばずに PCR から NGS 解析まで行うことが可能であり、発展途上国などの実験環境が十分ではない場所での耐性菌分離株の遺伝学的解析や、その分子疫学の調査に有用なツールと考えられた。

## JANIS 検査部門薬剤耐性菌分離率の推移と 2016 年地域別耐性菌分離状況報告

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター

川上小夜子、矢原耕史、筒井敦子、柴山恵吾

### JANIS 検査部門参加状況と検査検体の割合

2016 年の JANIS 検査部門参加医療機関数は 1,653 施設で、前年より 218 施設増加した。病床数別内訳は、900 床以上の全国医療機関では 83.6%が参加し、500~899 床では 80.5%、200~499 床では 41.7%、200 床未満では 6.6%が参加するに至った。前年に比較すると 200~499 床では 840 施設から 925 施設へ増加し、200 床未満では 258 施設から 384 施設への増加がみられた。

集計検体の総数は 7,857,602 検体であり、血液検体が最多で 32.6%、次いで呼吸器 28.3%、尿 12.8%、便 7.4%、髄液 1.2%、その他 17.7%であった。

### 特定の耐性菌分離率の推移

2008 年から 2016 年の 9 年間に MRSA の分離率（耐性菌分離患者数÷検体提出患者数 x100）は 10.46%から 6.48%へ減少し、MDRP は 0.23%から 0.06%へ、カルバペネム耐性緑膿菌は 1.45%から 0.82%へ減少した。一方、第三世代セファロスポリン耐性大腸菌は 0.62%から 2.19%へ増加し、第三世代セファロスポリン耐性肺炎桿菌は 0.17%から 0.36%へ、フルオロキノロン耐性大腸菌は 1.79%から 4.0%へと増加した。

変動がみられなかった耐性菌としては VRE の 0.02%、MDRA の 0.005%がある。CRE は 2014 年から集計を開始したが、2014 年の 0.49%から 0.29%へと減少した。

### 地域別耐性菌の分離状況

2016 年の VRSA を除く特定の耐性菌 10 種の分離状況は、MDRA が 18 都道府県から分離され、VRE は 32 都道府県から、MDRP は鳥取県と佐賀県を除く 45 都道府県から、その他の耐性菌は全ての都道府県から分離された。また、MDRA は 8 都道府県において、VRE は 5 都道府県の分離率が、他都道府県に比較して目立って高かった。

特定の耐性菌で平均分離率を超えた都道府県の割合を東日本と西日本で比較すると、第三世代セファロスポリン耐性大腸菌とフルオロキノロン耐性大腸菌について、西日本の方が有意に高かった。また、それ以外の耐性菌についても、有意差はないものの、PRSP と MDRA 以外は西日本での分離が多かった。

# MEMO

A series of horizontal dashed lines for writing.





