

会場までのアクセス



お車で： 関越自動車道「東松山 IC」より、県道 47 号線で深谷方面へ約 15 分

電車で：

- ・上越・北陸新幹線「熊谷駅」から、新幹線の到着時刻に合わせた研究会用のシャトルバスを運行予定です(所要時間: 約 25 分)
- ・東武東上線森林公園駅北口よりホテル行きのシャトルバスもあります。
(詳細はホテル HP をご覧ください)
- ・お帰りの終了時刻に合わせたシャトルバスを運行予定です(ホテル⇄熊谷駅)

ご 案 内

1. 参加受付

受付は11月13日（金）12:00より研修センター1F「カエサル」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 2,000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。
- ・ 今回は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, PowerPoint2013）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。
*万一、発表用 PC で正しく発表ファイルが開けない場合には、事前にご相談いただいた上でご自身の PC を使用していただくようお願い申し上げます（この場合は Zoom での同時配信は行いません）。液晶プロジェクターの入力端子は Dsub-15 ピンのみです。必要に応じてアダプターを各自ご準備下さい。
- ・ 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 49 回薬剤耐性菌研究会プログラム

2020 年 11 月 13 日 (金)

12:55～17:30

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：久留島 潤 (群馬大学)

グラム陰性菌

大腸菌の病原性に寄与する膜局在性蛋白質複合体 Tol/Pal システムの役割

○平川秀忠¹，鈴江一友³，滝田綾子¹，栗津周子³，久留島潤¹，富田治芳^{1,2}

(群馬大学大学院 医学系研究科¹細菌学，²附属薬剤耐性菌実験施設，³生体防御学)

鶏肉からの *Serratia fonticola* の分離と minor ESBL である FONA の解析

○谷本弘一¹，野村隆浩²，橋本佑輔²，平川秀忠²，富田治芳^{1,2}

(群馬大学大学院 医学系研究科¹附属薬剤耐性菌実験施設，²細菌学)

セフトジジム耐性 *Serratia marcescens* の院内伝播における bla_{TEM-61} 保有プラスミド /Tn2トランスポゾン拡散のダイナミクス

○林航¹，飯村将樹²，泉克俊²，吉田諭史²，小出将太¹，曾我英司²，長野由紀子^{3,4}，
荒川宜親^{3,4}，長野則之^{1,2}

(¹信州大学大学院 総合医理工学研究科，²信州大学大学院 医学系研究科，³修文大学医療科学部 臨床検査学科，⁴名古屋大学大学院 医学系研究科)

愛玩動物由来 *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤感受性の現状と多剤耐性ヒト高リスク国際流行クローン ST235 の出現

○泉克俊¹，林航²，飯村将樹¹，吉田諭史¹，曾我英司¹，小出将太²，伊從慶太³，
下池健太³，高野慎也⁴，北川真喜⁴，長野由紀子⁵，長野則之^{1,2}

(¹信州大学大学院 医学系研究科，²信州大学大学院 総合医理工学研究科，³株式会社 VDT，⁴極東製薬工業株式会社，⁵修文大学医療科学部 臨床検査学科)

14:00～ 14:45

座長：和知野 純一（名古屋大学）

大阪府内で分離した百日咳菌の分子疫学解析および薬剤耐性について

○山口貴弘¹，勝川千尋²，河原隆二¹，川津健太郎¹

（¹地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所，²大阪府立大学 生命環境科学研究科）

グラム陽性菌

Mycobacterium abscessus complex のマクロライド誘導耐性に関する微生物学的検討

○吉田志緒美，露口一成，小林岳彦，井上義一，鈴木克洋

（国立病院機構近畿中央呼吸器センター）

侵襲性ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌の全ゲノム解析

○小出将太^{1,5}，林航¹，飯村将樹²，吉田諭史²，泉克俊²，木村幸司³，荒川宜親^{3,4}，
長野由紀子^{3,4}，長野則之^{1,2}

（¹信州大学大学院 総合医理工学研究科，²信州大学大学院 医学系研究科，³名古屋大学大学院 医学系研究科，⁴修文大学医療科学部 臨床検査学科，⁵長野県立こども病院）

～☕☕ coffee break 14:45～15:00 ☕☕～

15:00～ 16:15

座長：久恒 順三（国立感染症研究所）

疫学と検出方法

IMP-6 表現型を有する腸内細菌目細菌の地理的分布と抗菌薬使用量との関連性：薬剤感受性全国サーベイランスデータを用いた解析

○平林亜希¹，矢原耕史¹，梶原俊毅¹，菅井基行¹，柴山恵吾^{1,2}

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

Python を用いた薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドの鳥瞰的表示とその系統解析

○津田裕介¹，和知野純一¹，木村幸司¹，荒川宜親^{1,2}

（¹名古屋大学大学院 医学系研究科 分子病原細菌学，²修文大学 医療科学部 臨床検査学科）

CTX-M 遺伝子保有 I1 プラスミドの POT 法による分類

○鈴木匡弘，土井洋平

（藤田医科大学 医学部 微生物学講座）

Drug Susceptibility Testing Microfluidic device (DSTM)法を用いた迅速β-ラクタマーゼ
検査法:血液培養陽性検体への応用

○小川美保¹, 坂田竜二¹, 佐々木真一¹, 市村禎宏¹, 松本佳巳^{2,3}

(¹(株)ビー・エム・エル総合研究所, ²(株)フコク マイクロ TAS 開発グループ,
³大阪大学産業科学研究所)

2019年のJANISデータから見る薬剤耐性菌の動向

○川上小夜子¹, 矢原耕史¹, 柴山恵吾^{1,2}, 菅井基行¹

(国立感染症研究所 ¹薬剤耐性研究センター, ²細菌第二部)

~☕☕ coffee break 16:15~16:30~☕☕

16:30 ~ (17:30)

話題提供

座長:小川 美保 (株式会社ビー・エム・エル)

AMRに関する最近の話題 -これまでとこれから-

菅井 基行

(国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター)

一般演題：発表 12 分、討論 3 分

9:00~10:00

座長：多田 達哉(順天堂大学)

CPE/CRE (1)

同一病棟の臨床材料由来 *Acinetobacter lwoffii* と 1 年前に先行して検出された洗浄用シンク由来 *A. pittii* の保有する bla_{NDM-1} プラスミドの比較解析

○飯村将樹¹，林航²，堀内一樹³，新井恵理子³，名取達矢³，鈴木真³，松本剛³，泉克俊¹，吉田諭史¹，長野由紀子^{4,5}，荒川宜親^{4,5}，長野則之^{1,2}

(¹信州大学大学院 医学系研究科，²信州大学大学院 総合医理工学研究科，³信州大学医学部附属病院 臨床検査部，⁴修文大学医療科学部 臨床検査学科，⁵名古屋大学大学院 医学系研究科)

病院下水由来複数菌種に潜在する GES-5, -24 カルバペネマーゼ産生菌及び国内で初めての GES-24・VEB-1ESBL 同時産生菌の出現

○曾我英司^{1,2}，林航³，飯村将樹²，泉克俊²，吉田諭史²，于連升⁴，鹿山鎮男⁴，菅井基行⁴，長野由紀子⁵，長野則之^{2,3}

(¹総合病院中津川市民病院検査科，²信州大学大学院 医学系研究科，³信州大学大学院 総合医理工学研究科，⁴国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター，⁵修文大学医療科学部 臨床検査学科)

病院下水環境に認められた bla_{GES-5} ， bla_{GES-24} 及び bla_{GES-24}/bla_{VEB-1} 保有プラスミドの特性解析

○林航¹，曾我英司^{2,3}，飯村将樹³，泉克俊³，吉田諭史³，于連升⁴，鹿山鎮男⁴，菅井基行⁴，長野由紀子⁵，長野則之^{1,3}

(¹信州大学大学院 総合医理工学研究科，²総合病院中津川市民病院 検査科，³信州大学大学院 医学系研究科，⁴国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター，⁵修文大学医療科学部 臨床検査学科)

メロペネム耐性，イミペネム感性・家禽病原性大腸菌 (*APEC*) 関連病原遺伝子保有 *Escherichia coli* 臨床分離株の解析

○吉田諭史¹，林航²，手塚佳子³，飯村将樹¹，泉克俊¹，長野由紀子⁴，長野則之^{1,2}

(¹信州大学大学院 医学系研究科，²信州大学大学院 総合医理工学研究科，³松本

市医師会臨床検査センター，⁴修文大学医療科学部 臨床検査学科)

～☕☕ coffee break 10:00～10:15 ☕☕～

10:15～11:15

座長：林 航 (信州大学)

CPE/CRE (2)

医療施設で分離されたカルバペネム耐性 *Pseudomonas putida* グループ菌株の分類と分子疫学解析

○遠矢真理¹，多田達哉¹，霜島正浩^{2,3}，寺本華奈江⁴，小川美保²，上地幸平⁵，前田士郎⁵，San Mya⁶，Htay Htay Tin⁶，藤田次郎⁷，切替照雄¹

(¹順天堂大学大学院医学研究科微生物，²株式会社ビー・エム・エル，³株式会社スギヤマゲン，⁴株式会社島津製作所，⁵琉球大学医学部附属病院検査 輸血部，⁶National Health Laboratory，⁷琉球大学医学部附属病院)

大阪府内で分離された mCIM 陽性 *Enterobacter cloacae* complex 株の解析

○河原隆二，山口貴弘，安達史恵，安楽正輝，川津健太郎
(大阪健康安全基盤研究所)

日本の医療施設で分離されたカルバペネム耐性 *Providencia* spp. の細菌学的・遺伝学的特性

○岩田秀¹，多田達哉¹，菱沼知美¹，遠矢真理¹，葉原京子¹，大城聡¹，小川美保²，霜島正浩²，切替照雄¹
(¹順天堂大学医学部微生物学講座，²株式会社 BML)

日本の医療施設で分離された VIM 型カルバペネマーゼ産生 MDRP の分子疫学解析

○菱沼知美¹，多田達哉¹，遠矢真理¹，霜島正浩^{2,3}，切替照雄¹
(¹順天堂大学大学院医学研究科微生物学，²株式会社ビー・エム・エル，³株式会社スギヤマゲン)

11:15～

閉会の挨拶

小川 美保 (株式会社ビー・エム・エル)

11月13日（金）16:30～(17:30)

話題提供

AMRに関する最近の話題 -これまでとこれから-

菅井 基行

(国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター)

AMRに関する施策の最近の動きや薬剤耐性研究センターで進められている研究、耐性菌バンクなどについて、センター長であり当研究会会長である菅井先生にお話し
いただく予定です。

一般演題抄録集

大腸菌の病原性に寄与する 膜局在性蛋白質複合体 Tol/Pal システムの役割

○平川秀忠¹、鈴江一友³、滝田綾子¹、栗津周子³、久留島潤¹、富田治芳^{1,2}

¹群馬大学大学院 医学系研究科 細菌学,

²群馬大学大学院 医学系研究科 附属薬剤耐性菌実験施設,

³群馬大学大学院 医学系研究科 生体防御学

[目的] Tol/Pal システムは、大腸菌が産生する膜蛋白質の複合体である。私たちは以前に、尿路病原性大腸菌の産生する Tol/Pal システムが、尿路系細胞および、経尿道感染マウスに対する病原性に寄与することを発見した。今回は、腸管出血性大腸菌の腸管病原性における Tol/Pal システムの役割について検討を行った。

[方法] 腸管出血性大腸菌(EHEC) O157 Sakai 株の *tol/pal* 欠損株を作製し、代表的な病原性因子である Shiga toxin(Vero toxin)および、3 型分泌蛋白質の産生量を、ラテックス凝集法および、各種抗体を用いたウエスタンブロッティングにより親株と比較した。病原性に重要な運動性は、軟寒天培地上での運動性試験および、液体培地中での移動の様子を顕微鏡下でモニタリングすることにより評価を行った。HeLa 細胞に対する病原性評価方法として、付着菌数の計測および、アクチンの集積を顕微鏡下で観察をすることで行った。EHEC 感染症の代替動物感染実験モデルである *Citrobacter rodentium* を用いてマウスの腸管内における病原性評価を行った。

[結果] EHEC の *tol/pal* 欠損株は、親株と比べて 3 型分泌蛋白質の発現量に変化は無いものの、分泌量は大きく低下していた。一方で、Shiga toxin の発現量と分泌量は、共に親株と同程度であった。さらに、*tol/pal* 欠損株は、親株と比べて低い運動性を示し、かつ HeLa 細胞に対する付着能は親株の半分程度であった。さらに、EHEC の親株を感染させた HeLa 細胞は高頻度にアクチンの集積が認められたのに対し、*tol/pal* 欠損株を感染させた HeLa 細胞においてはアクチンの集積は低頻度であった。野生株と *tol/pal* 欠損株を用いてマウスに経口感染を行ったところ、野生株を感染させたマウスは、激しい腸炎に伴う下痢を起こした後、8 日目までで全頭死亡した。それに対して、*tol/pal* 欠損株感染群では、下痢の兆候は観察されず、少なくとも 21 日後まで生存が認められた。

[考察] 以上の結果から、Tol/Pal システムは、腸管病原性においても重要な役割を果たすことが示された。

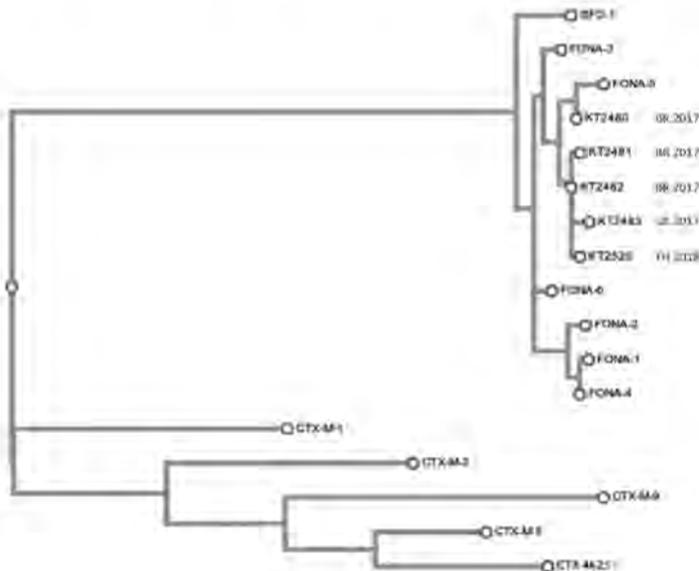
鶏肉からの*Serratia fonticola*の分離とminor ESBLである FONAの解析

○谷本弘一¹、野村隆浩²、橋本佑輔²、平川秀忠²、富田治芳^{1,2}
群馬大学大学院 医学系研究科 ¹附属薬剤耐性菌実験施設、
²細菌学

【はじめに】 我々は2017年と2018年の2年間に国内外から集められた鶏肉からESBLやAmpC型β-lactamaseを産生する腸内細菌科細菌を分離し、β-lactamase遺伝子の型別を行った。その過程で“minor ESBL”とされるFONAをコードする*bla*_{FONA}遺伝子をもつ *S. fonticola* 5株を輸入鶏肉から分離した。また、2019年に新たに7株が分離されたので合わせて報告する。

【方法】 国内271サンプル、国外310サンプルの鶏肉を収集し、阻害剤実験でESBLやAmpCの表現型を示すCTX、CAZ耐性株 (1 mg/L) を選択した。multiplexPCRでESBLやAmpC型β-lactamase遺伝子の保有を確認し、保有が確認されなかった株についてPCRで*bla*_{FONA}遺伝子の存在を確認した。ORF全領域をPCRにて分離し塩基配列を決定した。DNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列を元にして系統樹を描かせ、これまでに報告されている*bla*_{FONA}遺伝子(1～6)との関係を調べた。

【結果と考察】 *bla*_{FONA}遺伝子をもつ株が輸入鶏肉から12株 (2017年4株、2018年1株、2019年7株) 分離された。検体の輸出国はブラジル (2017年3株、2019年7株) タイ (2018年1株)、アメリカ合衆国 (2017年1株) 3ヶ国であった。それぞれの株から分離した*bla*_{FONA}遺伝子のORF全領域をシーケンスしそこから推測されるアミノ酸配列を元に系統樹を描いた。(2017、2018年分離株である5株による系統樹を下に示す。) 予想どおり今回対象としたFONAは、FONAが起源であろうと考えられている、プラスミド上にコードする遺伝子が存在する事で知られているSFO-1と非常に近い関係にあったが、CTX-Mとは離れていた。今回の5つのFONAは由来検体の原産国や輸入時期が異なり、互いの独立であろうと考えられるにもかかわらず、これまでFONA-1からFONA-6として知られているものの中でも、互いに非常に近い関係にあることがわかった。これまでのFONAはいずれも野菜や環境から分離された株の由来であったことから、今回鶏肉から分離された*S. fonticola* は鶏に常在できる性質を持っている可能性が示唆される。



セフトラジジム耐性 *Serratia marcescens* の院内伝播における bla_{TEM-61} 保有プラスミド/Tn2 トランスポゾン拡散のダイナミクス

○林航¹, 飯村将樹², 泉克俊², 吉田諭史², 小出将太¹, 曾我英司²,
長野由紀子^{3,4}, 荒川宜親^{3,4}, 長野則之^{1,2}

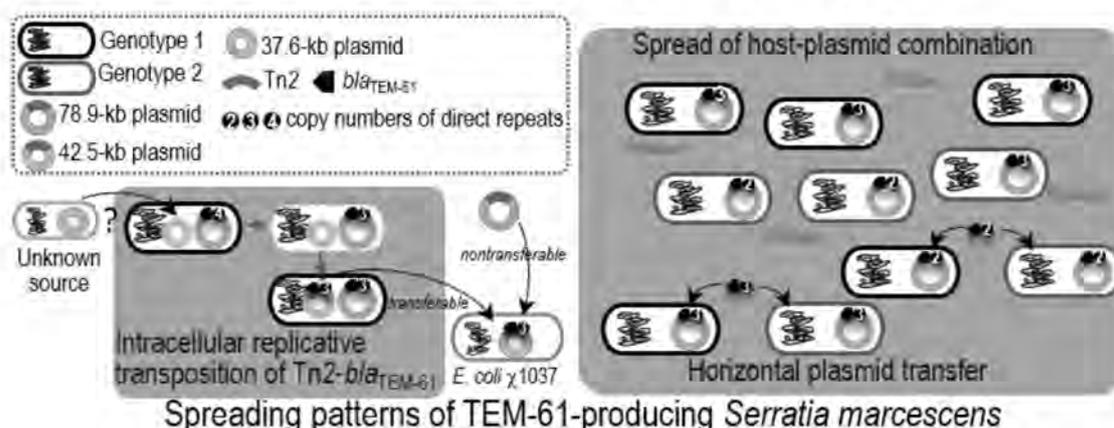
¹信州大学大学院 総合医理工学研究科, ²信州大学大学院 医学系研究科,
³修文大学医療科学部 臨床検査学科, ⁴名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】本報ではセフトラジジム耐性 *Serratia marcescens* の院内伝播の間にプラスミドや Tn2 トランスポゾンが bla_{TEM-61} の拡散にどのように関連していたかを明らかにする。

【材料と方法】中規模医療機関で1年の間院内伝播が推定された20事例由来 TEM-61 ESBL 産生 *S. marcescens* 20株 (呼吸器系材料由来15株, 泌尿器系材料由来4株, 膿由来1株) から pulsotype 等に基づき選択した12株 (pulsotype I の Sm1, 7, 8, 10, 11, 14, 18 及び pulsotype II の Sm2, 3, 4, 6, 20) を対象に全ゲノム解析を実施し, 院内伝播のメカニズムの包括的な解明を試みた。

【結果と考察】SNP, wgMLST による系統解析の結果, pulsotypes I の7株と pulsotypes II の5株は pulsotypes に相応してそれぞれ Genotype 1 と Genotype 2 のクラスターに分別された。また, これら2つのクラスターは病原遺伝子としてヒト臨床由来 *S. marcescens* に特徴的であるヘモリジン関連遺伝子 *shlB* 及び *hpmA* を保有し, 環境由来株 (水系環境, 植物等) の遺伝系統群には属さず, ヒト臨床由来株の遺伝系統群に属していた。12株は *S. marcescens* に特有な IV 型分泌系の遺伝情報をコードするプラスミド (約 78.9 kb) を共有し, それらには bla_{TEM-61} を担う Tn2 (*tnpA-tnpR-bla_{TEM-61}*) が存在していた。さらに Sm14 はヒト腸内細菌目細菌及び *Pseudomonas aeruginosa* 保有プラスミドの全塩基配列と高い配列類似性を示すプラスミド (約 37.6 kb) も保有していた。注目すべきことに, これと同一の backbone を有し bla_{TEM-61} を担う Tn2 が挿入された高頻度伝達性プラスミド (約 42.5 kb) が Sm10 に認められた。 bla_{TEM-61} の上流には bla_{TEM-2} に認められる *Pai/Pb* プロモーターが存在し, *Pb* の-10領域の下流に15塩基 (5'-ATGTCATGATAATAA-3') を1コピーとする重複配列が存在し, 株間で2~4コピーと重複配列数に多様性が認められた。

本研究で bla_{TEM-61} が異なるコピー数の重複配列が存在する新規なプロモーター配列を有することが見出された。さらに bla_{TEM-61} の拡散には本 *bla* 遺伝子を担う狭宿主域プラスミドの2種の遺伝系統株 (Genotype 1, Genotype 2) 間での水平伝播とプラスミドを保有する Genotypes 1, 2 自体の伝播事象に加え, 同時に保有する高頻度伝達性を示す広宿主域プラスミドへの Tn2 の転移事象が関与していることが明らかとなった (下図)。



愛玩動物由来 *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤感受性の現状と多剤耐性ヒト高リスク国際流行クローン ST235 の出現

泉克俊¹, 林航², 飯村将樹¹, 吉田諭史¹, 曾我英司¹, 小出将太², 伊従 慶太³, 下池 健太³, 高野慎也⁴, 北川真喜⁴, 長野由紀子⁵, 長野則之^{1,2}

¹信州大学大学院 医学系研究科, ²信州大学大学院 総合医理工学研究科, ³株式会社 VDT, ⁴極東製薬工業株式会社, ⁵修文大学医療科学部 臨床検査学科,

【目的】愛玩動物由来 *Pseudomonas aeruginosa* に対する薬剤感受性の調査報告は極めて少ない。本報は臨床材料由来株を対象に薬剤感受性の実態を把握することを目的とした。また、愛玩動物では世界で初めて確認された多剤耐性ヒト高リスク国際流行クローン ST235-O11 の解析知見を報告する。

【材料と方法】全国の動物病院より株式会社 VDT により収集されていた 2015-2019 年の臨床材料由来 *P. aeruginosa* 240 株 (イヌ由来 206 株, ネコ由来 33 株) について CLSI 準拠の微量液体希釈法にて各種抗菌薬の MIC を測定した。カルバペネム耐性株 17 株を対象にカルバペネマーゼ遺伝子の PCR 検索及び PaβN を用いた排出ポンプ阻害試験を行った。また、カルバペネム系薬耐性且つ CIMTris の判定が不定であった 2 株を対象に NovaSeq 6000 による全ゲノム解析を実施した。

【結果と考察】各種抗菌薬の感受性率は IPM が 81.3% (MIC₅₀/MIC₉₀ 2/4 μg/mL), MEPM が 94.6% (MIC₅₀/MIC₉₀ ≤ 0.5/2 μg/mL), AMK が 99.2% (MIC₅₀/MIC₉₀ 4/8 μg/mL), CPM が 70.8% (MIC₅₀/MIC₉₀ ≤ 0.5/4 μg/mL) であった (表 1)。IPM と CPM の耐性率が既報の愛玩動物由来株の報告と比較し高いことが注目された。カルバペネム系薬耐性 17 株 (IPM 耐性 12 株, MEPM 耐性 1 株, IPM・MEPM 耐性 4 株) ではカルバペネマーゼ遺伝子 *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES} は検出されなかった。

表 1 愛玩動物由来 *Pseudomonas aeruginosa* 240 株に対する各種抗菌薬の耐性率

Antimicrobials	Companion animals				Humans (data from JANIS*)	
	MIC range (μg/mL)	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	Resistance rate (%)	Resistance rate (%)	
					Inpatients	Outpatients
PIPC	≤4-128	8	16	0.83	10.3	3.4
PIPC/TAZ	≤8/4-128/4	≤8/4	16/4	0.83	8.4	2.5
CAZ	≤2-64	≤2	8	0.83	8.7	2.9
CPM	≤2-32	4	8	0.42	5.9	2.3
AZT	≤2-64	8	32	11.25	13.3	6.5
IPM	≤1-64	2	4	6.67	16.2	5.7
MEPM	≤0.5-16	≤0.5	4	2.08	10.6	2.8
GM	≤1-32	2	4	2.08	3.1	2.6
AMK	≤2-64	4	8	0.42	0.9	0.8
TOB	≤2-32	≤2	≤2	1.67	-	-
CPFX	≤0.5-8	≤0.5	4	19.17	-	-

*Japan Nosocomial Infections Surveillance

PaβN 添加により IPM 耐性 12 株中 6 株, IPM・MEPM 耐性 4 株中 3 株で IPM and/or MEPM の MIC が 2 管差以上低下したことから、カルバペネム耐性には多剤排出ポンプの過剰発現の関与が示唆された。ネコ耳漏由来の 1 株はカルバペネム系薬 (IPM 32 μg/mL, MEPM 8 μg/mL), GM, CPM に耐性で多剤耐性緑膿菌と判定されたが、全ゲノム解析の結果ヒト高リスク国際流行クローン ST235-O11 と同定された。保有薬剤耐性遺伝子として *aadB*, *aadA2*, *cmlA10*, *sul1* に加え、染色体上の class 1 integron 構造中に多剤耐性遺伝子カセット *qnrVC1-aac(6)-Ib-blaOXA-10-aadA1-dfrA14* が認められた。また、染色体性 AmpC の発現調節因子 AmpR に G273E, M288R の置換が認められた。さらに、外膜タンパク質 OprD の N 末端が Δnt 1-75 に伴い欠損していたのに加え、多剤排出ポンプ MexEF-OprN の負の調節遺伝子 *mexS* にフレームシフト変異 (Δnt 362T) による stop codon が出現していた。 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parD* のキノロン耐性決定領域 (QRDR) に変異は認められなかった。また、イヌ子宮由来の 1 株についてはカルバペネム系薬 (IPM >64 μg/mL, MEPM 16 μg/mL) に耐性、アミノグリコシド系薬及びキノロン系薬に感性であった。全ゲノム解析の結果本菌は ST348-O2 と同定されたが、この ST は世界的に分布しているクローンである。また、AmpR に R244W, G273E の置換に加え、OprD にナンセンス変異による W65stop が認められた。

ヒトと生活圏を共にする愛玩動物においてカルバペネム耐性 *P. aeruginosa* が多く検出されたことはワンヘルスの観点から獣医学領域での抗菌薬の適正使用の重要性を示唆するものである。さらに、愛玩動物では初めての報告となる多剤耐性ヒト高リスク国際流行クローン ST235-O11 が確認されたことは公衆衛生上重要な問題を提起している。

大阪府内で分離した百日咳菌の分子疫学解析および薬剤耐性について

○山口貴弘¹、勝川千尋²、河原隆二¹、川津健太郎¹

¹地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 ²大阪府立大学 生命環境科学研究科

【背景】

百日咳は特有のけいれん性の痙咳発作を生じ、生後 6 ヶ月未満の乳児では呼吸困難により死に至る危険性が高い急性呼吸器感染症である。百日咳の治療には、マクロライド系抗菌薬を第一選択薬として用いることが推奨されているが、近年マクロライド耐性百日咳菌 (Macrolide-resistant *Bordetella pertussis*: MRBP) が問題視されている。1994 年アメリカ・アリゾナで初めて報告されて以降、フランス、中国、台湾、イラン、ベトナムで報告があり、2014 年には中国の一部地域において本耐性菌によるアウトブレイクが報告されている。このため国内においても百日咳菌の薬剤耐性を監視しておく必要がある。本研究では大阪府内で 2015 年以降に分離した百日咳菌について、薬剤感受性試験および分子疫学解析を実施したので報告する。

【方法】

2015 年から 2019 年に大阪府内医療機関から、菌株または鼻咽頭ぬぐい液の提供を受けた。臨床検体については、LAMP 法によるスクリーニングおよびボルデテラ CFDN 培地による培養を実施した。分離菌株の同定には、MALDI-TOF/MS、百日咳 I 相免疫血清を用いた。得られた 33 株について感受性試験 (エリスロマイシン)、およびマクロライド耐性関連遺伝子 (23SrRNA) の配列解析を行なった。また分離菌株と国内外の株との関連性を明らかにするために、multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) 法による遺伝子解析を実施した。

【結果・考察】

33 株の薬感受性試験および 23SrRNA の配列解析の結果、2018 年の 1 株がマクロライド耐性を持ち、23SrRNA に変異を持つことが確認された。本耐性菌の MLVA 型は MT195 であり、中国でアウトブレイクを引き起こしたマクロライド耐性百日咳菌と同型であった。本耐性菌の分離は国内初であり、また国内で MT195 は非常に稀であることから中国から伝播してきた可能性が示唆された。

MLVA 法による遺伝子解析の結果、世界的な流行株と言われている MT27 が 55%であり、日本全体の結果と類似していた。

MRBP が日本国内でも分離されたことから、今後さらに注視する必要がある。

【謝辞】

菌株の分与等研究にご協力いただきました大阪府内医療機関の先生方に深謝いたします。

Mycobacterium abscessus complex のマクロライド誘導耐性に関する
微生物学的検討

国立病院機構近畿中央呼吸器センター

○吉田志緒美、露口一成、小林岳彦、井上義一、鈴木克洋

【背景】最新の CLSI ガイドラインでは、肺 *M. abscessus* complex 症を治療する上で、臨床分離株の薬剤感受性検査の実施を推奨している。また、同症の治療が確立されていない中、マクロライドの間欠的治療が期待されるが、微生物学的に誘導耐性を評価する方法は限られている。【目的】間欠的治療の効果を評価する表現型薬剤感受性検査の確立を目指した手法の検討。【方法】MIC 測定 3 日目の MIC コロニーを単離後、薬剤フリー培地で培養した液で MIC 測定を繰り返し、試験管内で間欠的な状態をシミュレーションした。【結果】マクロライド暴露を繰り返した結果、亜種である *M. abscessus*、*M. massiliense* とも、3 日目で同じ MIC 値を示し、可逆的な誘導耐性能が確認できた。しかし、*M. abscessus* は暴露回数が増えるにつれ、誘導耐性となるタイミングが短くなった。【考察】マクロライドに対する可逆的な *M. abscessus* 誘導耐性能は、薬剤暴露によりが惹起されやすくなる傾向が示された。微生物学的表現型特性を生かした実臨床でのマクロライド治療予測法の検証が望まれる。

侵襲性ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌の全ゲノム解析

小出将太^{1,5}, 林航¹, 飯村将樹², 吉田諭史², 泉克俊², 木村幸司³, 荒川宜親^{3,4}, 長野由紀子^{3,4}, 長野則之^{1,2}

¹信州大学大学院 総合医理工学研究科, ²信州大学大学院 医学系研究科,

³名古屋大学大学院 医学系研究科, ⁴修文大学医療科学部 臨床検査学科, ⁵長野県立こども病院

【目的】ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌 (PRGBS) は国内では高齢者の呼吸器材料より多く報告されている。本報では高齢者の侵襲感染症血液由来株の全ゲノム解析知見を報告する。

【材料と方法】2008 年から 2016 年の間に国内の医療機関で収集された血液由来 PRGBS 8 株 (SU97, SU85, SU187, SU233, SF680, SF942, SF1510 及び MRY08-1422) を解析対象とした。全ゲノム解析には Illumina Novaseq6000/PE150 を用い、*de novo assembly* には A5-miseq assembly pipeline を使用した。

【結果と考察】PRGBS 8 株 (PCG MIC 0.25-0.5 µg/mL) のうち 6 株は ST1 で血清型 Ia が 4 株, III が 2 株であった。残り 2 株はそれぞれ血清型 Ib-ST10 と III-ST464 であった。SU97, SU85, SU187, SU233 の 4 株は同一医療機関の入院患者から検出されたが、患者の予後はいずれも不良であった。これら 4 株は PBP_s のアミノ酸置換を共有し、且つ血清型 Ia, ST1 と同定され医療関連感染との関わりが推察される。しかしながら、LVFX の MIC が異なり耐性株では GyrA/ParC のキノロン耐性決定領域 QRDR に S79C/S79Y や S81L/S79Y が認められた。また、ISSag8 や Tn6009 などの mobile genetic elements (MGEs) を共有していた。SF680, SF942, SF1510 の 3 株は別の同一医療機関から検出されたが、SF942 と SF1510 の 2 株は血清型 III, ST1 で PBP_s のアミノ酸置換を共有していた。SF680 は血清型 Ib, ST10 で PBP_s のアミノ酸置換も先の 2 株とは異なっていた。注目すべきことにこの株では PBP2A で一塩基挿入 (566_567insT) による停止コドンが生じていた。このフレームシフト変異が細胞壁合成に及ぼす影響については詳細に検討していく予定であるが、*S. pneumoniae* の *pbp* 遺伝子破壊株を用いた研究では *pbp2a* の単独破壊では生存に影響は及ぼさないが、*pbp2a* と *pbp1a* の共破壊の場合生存不能であることが報告されている。これら 3 株は LVFX 耐性で GyrA/ParC の QRDR に S81L/S79F が認められたが、薬剤耐性遺伝子や MGEs の保有プロファイルは異なっていた。MRY08-1422 は血清型 III, ST464 (CC23) で、PBP2X に 4 アミノ酸置換を有していたが PRGBS で高頻度に検出される V405A や Q557E は認められなかった。この株ではゲンタマイシン高度耐性を付与する *aac(6')-aph(2'')* が IS256 には含まれた形で存在していた。*aac(6')-aph(2'')* は enterococci や staphylococci に広く分布しているが、GBS では 2001~2014 年の BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance の結果 1,125 株中 2 株のみで確認されている。本報の PRGBS 8 株は、GBS の代表的な病原因子遺伝子である CAMP factor の *cfb*, C5a peptidase の *scpB*, hyaluronidase の *hylB*, laminin-binding protein の *lmb*, fibronectin-binding proteins の *fbsB* などを共有していた。しかしながら、同じく fibronectin-binding proteins の中では A 群レンサ球菌を起源とする *fbp54* も保有していること、一方 GBS 起源の *fbsA* や *pavA* は保有していないことが特徴であった。また、PRGBS 8 株中 5 株が β-hemolysin/cytolysin の *cyl* operon 中 *cylX* を保有していなかった。

本報の侵襲感染症血液由来 PRGBS 株において PBP2A に未成熟終止コドンが生じていたこと、GBS では極めてまれな *aac(6')-aph(2'')* が認められたことから本菌の生存や耐性機構についてのさらなる研究が必要と思われる。また、PRGBS の病原的意義は現時点で明らかではないが、新生児由来 GBS が保有する病原因子の多くが PRGBS でも確認されたことから今後も GBS, PRGBS を対象とした包括的な研究の必要性があるものと考えられる。

IMP-6 表現型を有する腸内細菌目細菌の地理的分布と抗菌薬使用量

との関連性：薬剤感受性全国サーベイランスデータを用いた解析

平林亜希¹ 矢原耕史¹ 梶原俊毅¹ 菅井基行¹ 柴山恵吾^{1,2}

¹国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター

²国立感染症研究所 細菌第二部

カルバペネマーゼを産生する腸内細菌目細菌は、プラスミドを介した伝播様式をとり、その拡がりは公衆衛生上、大きな問題となっている。IMP 型カルバペネマーゼを産生する腸内細菌目細菌は、特に日本で検出される頻度が高く、その中でも IMP-6 型の腸内細菌目細菌は、メロペネムに耐性を示すが、イミペネムに感性を示すというユニークな特徴を持つ。このため臨床検査室で見落とされることがあり、「ステルス型」と呼ばれている。日本での報告は一部の地域の医療機関に限定されており、都道府県をまたいだ分布やその影響因子は不明である。本研究では、抗菌薬使用に関連した IMP-6 表現型を有する腸内細菌目細菌の日本における地理的分布を明らかにした。2015 年および 2016 年に 1,400 以上の医療機関から報告された JANIS (Japan Nosocomial Infections Surveillance) データを用いて、IMP-6 に特徴的な抗菌薬感受性パターン (イミペネム感性, メロペネム耐性) を有する大腸菌および肺炎桿菌の都道府県別の分離頻度を集計した。全都道府県の約半数で IMP-6 表現型を有する株が検出され、全国の抗菌薬使用量データと組み合わせて解析したところ、カルバペネムではなく第三世代セファロスポリンの使用量と、IMP-6 表現型株の検出頻度との間には統計的に有意な関連があり ($p=0.006$ 、混合効果ロジスティック回帰)、フルオロキノロンの使用量と、IMP-6 表現型株の検出頻度との間には弱い関連があった ($p=0.043$)。第三世代セファロスポリンやフルオロキノロンの使用は、IMP-6 表現型を有する株を選択し、その拡がりに寄与する可能性が示された。

Python を用いた薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドの鳥瞰的表示とその系統解析

○津田 裕介¹、和知野 純一¹、木村 幸司¹、荒川 宜親^{1,2}

¹名古屋大学大学院・医学系研究科・分子病原細菌学

²修文大学・医療科学部・臨床検査学科

細菌が持つプラスミドは通常2本鎖環状 DNA で、プラスミド上には多数の薬剤耐性遺伝子が存在し、プラスミドが細菌間で伝達することにより薬剤耐性形質が菌株・菌種間に伝播・拡散する。プラスミドの系統学的分類は特定のプラスミドの起源や伝播の探索に寄与するだけでなく、薬剤耐性菌の拡散状況の把握と拡散防止につながる点で公衆衛生上も重要である。不和合性(Incompatibility, Inc)による Inc グループ、plasmid Multilocus Sequence Typing (pMLST)、mob といったプラスミドの分類方法が利用されているが、実用性の高いプラスミドの系統解析法は未だ構築されていない。また、今日ではプラスミドや染色体上の遺伝子に着目したプラスミドの相同性解析を目的とする様々なウェブサイトやソフトウェアを利用できるが、プラスミド間の塩基配列による相同性解析では相補的な配列や挿入配列により類似性の判定力が著しく低下してしまう可能性がある。加えて、数個のプラスミドを比較するツールを用いて多数のプラスミドを解析すると表示が複雑になり視認性が低下する可能性がある。多数のプラスミドを一挙に網羅的に可視化でき比較解析可能なツールは未だ構築や公開がされていないことから、プログラミング言語 Python を用い、多数のプラスミド上にある薬剤耐性遺伝子の種類や局在、配列順序、分布を鳥瞰的に表示することでプラスミドの系統解析を可能とするツールの作成を試みた。

Escherichia coli が持つプラスミドのうち tunicamycin resistance gene (*tmr*)を保有するプラスミドを *tmr* の塩基配列による blastn で検索し、274 のプラスミドを特定し解析した。各プラスミドに存在する薬剤耐性遺伝子は ResFinder のデータベースを用いた検索により同定した。そして、線形にした1つのプラスミドの薬剤耐性遺伝子の種類と局在を表示して、全てのプラスミドを *tmr* が中心となるように整列させた。多数のプラスミドについて薬剤耐性遺伝子の種類と局在、配列順序、分布の類似性に基づいて並び替えを行い、鳥瞰的な表示により可視化した。また、PlasmidFinder のデータベースを用いた検索によりプラスミドの Inc グループを特定し、Inc グループに従った表示も試みた。1つの Inc グループのみ同定されるプラスミドのうち、最も多い Inc グループは IncF (115 プラスミド)であった。一部のプラスミドは薬剤耐性遺伝子の局在や分布のプロファイルが異なっているが同一の Inc グループとして同定された。

そして、プラスミドの類似性に注目した並び替えを自動的に行うアルゴリズムを作成し、それに基づいた樹形図の描出が可能となった。今後はプログラムを公開するとともに、腸内細菌科細菌が持つその他薬剤耐性遺伝子について解析を拡大していく。

E-Mail : tsuda.yusuke@med.nagoya-u.ac.jp

CTX-M 遺伝子保有 I1 プラスミドの POT 法による分類

鈴木匡弘、土井洋平

藤田医科大学・医学部・微生物学講座

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌によるアウトブレイクにおいて、薬剤耐性遺伝子の菌株間・菌種間伝播を追跡する必要がある場合、プラスミド解析が欠かせない。しかし、プラスミド解析には Long read シーケンサーを用いた全ゲノム解析が必要となり、十分な検査がなされていない。そこで、プラスミド分子疫学解析を容易とするため、プラスミド解析のための PCR による分子疫学解析法 PCR-based ORF typing 法 (POT 法) の開発を試みた。対象プラスミドとして CTX-M 遺伝子の伝播に関与し、plasmid MLST 法 (pMLST) との比較が容易な I1 プラスミドを用い、CTX-M 遺伝子保有菌を用いた評価を行った。

NCBI データベースからダウンロードした 140 個のプラスミドシーケンスデータを用いて、I1-POT 法を設計した。検出 ORF として、I1 プラスミド以外のプラスミドや染色体からは検出されない 15 個を選び、2 反応系のからなる POT 法を設計した。臨床分離された 50 株の I1 プラスミド・CTX-M 遺伝子保有株を I1-POT 法で解析した。また、プラスミドデータにおける I1-POT 型は blast 検索による推定を行った。全てのプラスミドは ORF-based binarized structure network analysis of plasmids (OSNAp) による系統ネットワーク解析及び pMLST を行った。

I1-POT 型は OSNAp 系統ネットワークのクラスターを良く反映していた。また、I1-POT 法による遺伝子型 (I1-POT 型) と pMLST 型 (pST 型) との間に、高い相関が見られた。CTX-M-1 や CTX-M-8 に見られる OSNAp 系統ネットワーク上で近縁かつ異なる pST 型のプラスミドも識別可能であり、I1-POT 法によって、CTX-M 保有 I1 プラスミドの系統を同定可能であることが示された。POT 法によるプラスミド系統解析の可能性が示されたが、アウトブレイクへの関与が多い、N や F プラスミドへの応用が今後の課題である。

Drug Susceptibility Testing Microfluidic device (DSTM)法を用いた迅速β-ラクタマーゼ検査法:血液培養陽性検体への応用

○小川美保¹⁾、坂田竜二¹⁾、佐々木真一¹⁾、市村禎宏¹⁾、松本佳巳^{2,3)}

1) (株)ビー・エム・エル総合研究所、2) (株)フコク マイクロ TAS 開発グループ、3) 大阪大学産業科学研究所

【目的】血液培養陽性検体の耐性菌検査は、特に迅速性が求められる。マイクロ流路チップと顕微鏡を用いる DSTM (Drug Susceptibility Testing Microfluidic device)法により、血液培養陽性となった検体から簡単な前処理で菌液を調製し、直接感受性を測定する方法を以前に報告したが、同じ手法で3種のβ-ラクタマーゼを迅速に検出することを試みた。

【方法】朝に培養陽性となり、グラム染色およびMALDI-TOFMSの結果から、腸内細菌科細菌が検出された39検体を用いた。DSTMチップは、A～C群3種のβ-lactamaseスクリーニング用チップを用いた。培養陽性ボトルから検体を1mLマイクロチューブにとり、2,000 g、30 sec 遠心後、①上清を新しいチューブに移し、10,000 g、5 min 遠心した沈渣を2 mLのMH-brothに懸濁、または②上清を0.2 mL試験管に取り、1.8 mLのMH-brothを加え1h振盪培養した後、McF 0.4～0.5に濁度調製して用いた。2及び3h後に顕微鏡で形態変化をみて判定した。

【結果】①の調製法で2検体がMcF 0.4以下に留まった以外は、全てMcF 0.4以上の濁度が得られ、直接DSTM法を実施することで、4時間以内に全検体の結果を得ることができた。②の調製法では培養時間が1時間長くなるものの高速遠心が不要で、菌の感受性が高まることから、チップ内での培養は2hで全株容易に判定できた。5検体でESBLが、6検体でAmpCが陽性と判定され、MBL産生株は今回供した検体中にはなかった。これらは、パイテック2による耐性パターンの結果と一致した。

【考察】簡単な前処理で血培陽性検体を、直接DSTM法にかけてESBLやAmpC産生を容易に検出することができた。被検株の中にMBL産生株はなかったが、CREを用いた検討でMBLとESBLやAmpCといった複数の酵素を産生する菌の酵素も個々に検出可能であることを確認している。培養陽性となったその日のうちに結果を得ることができる迅速性に加え、AmpCが精度良く検出できるDSTM法は、迅速検査法として有用と考えられた。

2019年のJANISデータから見る薬剤耐性菌の動向

川上小夜子¹、矢原耕史¹、柴山恵吾^{1,2}、菅井基行¹
国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター¹、細菌第二部²

JANIS 検査部門の2019年集計対象医療機関数は前年より128施設増加し、2075施設であった。新規参加のうち105施設は200床未満の医療機関で、23施設は200～499床の医療機関であった。

入院患者における主要な菌種の分離率は、集計を開始した2008年以降 *S. aureus* がトップであったが、2018年からは *E. coli* がトップとなった。

入院患者のMRSAの分離率(MRSA分離患者数÷検体提出患者数×100)は2008年の10.5%以降低下傾向であったが、2016年の6.5%からは横ばいである。MRSAの病床数別分離率は、2014年以降 ≥ 200 床の医療機関では6%台であったが、 < 200 床の医療機関では9%台と高かった。都道府県別のMRSAの分離率を東日本と西日本に分けて比較すると、平均分離率を上回る都道府県の割合は西日本で有意に高かった。*S. aureus*における2019年のMIPIC耐性率は、入院患者では47.7%、外来患者では31.0%であった。

入院患者のフルオロキノロン耐性 *E. coli* の分離率は、2008年の1.8%から2019年の4.8%へと上昇傾向である。病床数別の分離率は ≥ 200 床では2014年の3.3%から2019年の4.4%へ、 < 200 床では5.2%から7.7%へ上昇した。都道府県別フルオロキノロン耐性 *E. coli* の分離率を東西に分けて比較すると、平均分離率を上回る都道府県の割合は西日本で有意に高かった。*E. coli*における2019年のLVFX耐性率は、入院患者では40.2%、外来患者では30.2%であった。

入院患者のCRE分離率は、2014年の0.49%から2017年の0.27%まで低下したが、2018年0.32%、2019年0.33%で推移している。病床数別の分離率は ≥ 200 床の医療機関の方が高く2019年の分離率は0.35%、 < 200 床では0.13%であった。都道府県別のCRE分離率を東西で比較した場合に有意差は見られなかった。

その他の薬剤耐性菌の動向についても報告予定である。

同一病棟の臨床材料由来 *Acinetobacter lwoffii* と 1 年前に先行して検出された洗浄用シンク由来 *A. pittii* の保有する *bla*_{NDM-1} プラスミドの比較解析

飯村将樹¹, 林航², 堀内一樹³, 新井恵理子³, 名取達矢³, 鈴木眞³, 松本剛³, 泉克俊¹, 吉田諭史¹, 長野由紀子^{4,5}, 荒川宜親^{4,5}, 長野則之^{1,2}

¹信州大学大学院 医学系研究科, ²信州大学大学院 総合医理工学研究科, ³信州大学医学部附属病院 臨床検査部, ⁴修文大学医療科学部 臨床検査学科, ⁵名古屋大学大学院 医学系研究科

【目的】 *Acinetobacter* spp. は病院環境における薬剤耐性因子のリザーバーとして医療関連感染対策上重要視されている。我々は臨床材料由来 NDM-1 産生 *Acinetobacter lwoffii* と、1 年前に同一病棟内洗浄用シンクから検出された既報の NDM-1 産生 *A. pittii* (JGAR vol. 21, 2020) の保有プラスミドの比較解析並びに *A. lwoffii* の特性解析を行った。

【材料と方法】 消化器外科入院患者の胆汁由来 NDM-1 産生 *A. lwoffii* について HiSeq による全ゲノム解析を実施した。

【結果と考察】 本菌は ANI 値に基づき *A. lwoffii* と確認された。*A. lwoffii* SU1904 は IPM (MIC >8 µg/mL) 及び MEPM (MIC 8 µg/mL) に耐性を示したが、アミノグリコシド系薬、キノロン系薬には感性であった。本菌の保有する *bla*_{NDM-1} は *aphA6-ISAbal25* の下流に存在し、*Acinetobacter* spp. に特有の VirB IV 型分泌系を有するプラスミド pSU1904NDM (総塩基配列長 43,651 bp, GenBank LC537594) に担われていた。さらに、pSU1904NDM では IS66 family elements (2,615 bp) を除く 41,037 bp の塩基配列が、同一病棟で 1 年前に処置室洗浄用シンクから検出された *bla*_{NDM-1} 保有 *A. pittii* のプラスミド pSU1805 (41,022 bp, LC483156) の配列と 99.8% 一致していた (Fig.)。また、本菌の染色体上には *A. lwoffii* に固有のカルバペネマーゼ遺伝子として新規な *bla*_{OXA-134-like} が認められ *bla*_{OXA-915} (LC537318) と命名された。本菌の病原遺伝子解析の結果、*A. baumannii* で認められるバイオフィーム形成に関与する遺伝子 (*ompA*, *bfmRS*)、II 型分泌系や VI 型分泌系関連遺伝子群、及び固相表面上での twitching 運動に必要な IV 型線毛関連遺伝子である *pil* 遺伝子群を保有していた。さらに重金属抵抗性に関わる多くの遺伝子 (*copRS*, *copABCD*, *actP*, *czcCBAD*) が認められた。

本研究では *A. pittii* から *A. lwoffii* への *bla*_{NDM-1} 保有プラスミドの環境中での水平伝播の可能性が示唆され、医療環境に定着する未認識の病原性・薬剤耐性 *Acinetobacter* spp. の積極的検出並びに患者への伝播経路を断ち切る環境対策の重要性を強調するものである。

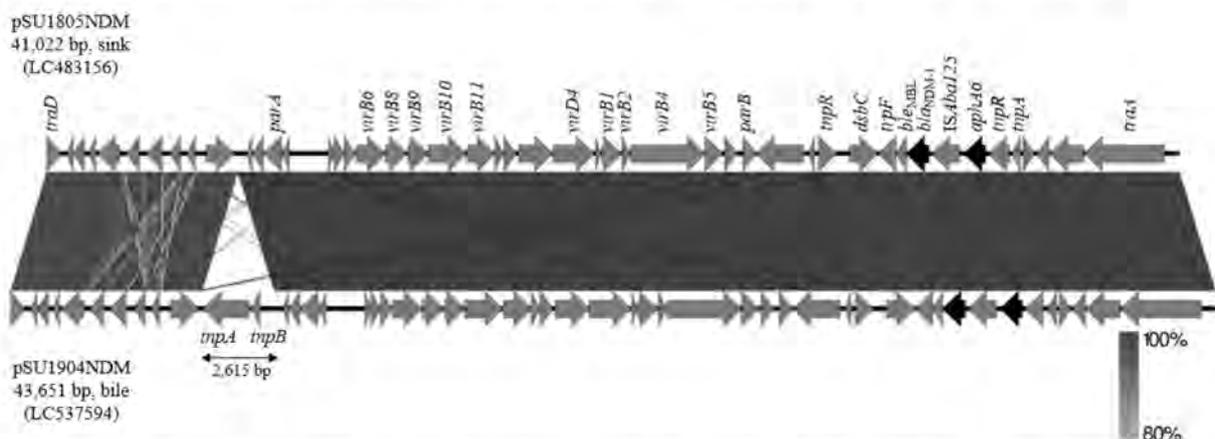


Fig. Linear comparison of the complete sequences of the plasmids pSU1805NDM and pSU1904NDM

病院下水由来複数菌種に潜在するGES-5、-24カルバペネマーゼ産生菌及び国内で初めてのGES-24・VEB-1 ESBL同時産生菌の出現

曾我英司^{1,2}, 林航³, 飯村将樹², 泉克俊², 吉田論史², 于連升⁴, 鹿山鎮男⁴,
菅井基行⁴, 長野由紀子³, 長野則之^{2,3}

¹総合病院中津川市民病院検査科, ²信州大学大学院 医学系研究科, ³信州大学大学院 総合医理工学研究科, ⁴国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター, ⁵修文大学医療科学部 臨床検査学科

【目的】病院下水は患者由来薬剤耐性グラム陰性桿菌の重要な環境リザーバーとして認識されている。本報ではGES型カルバペネマーゼ産生菌の検出歴のない病院の下水由来複数菌種に認められたGES-5, GES-24産生菌について報告する。

【材料と方法】岐阜県内医療機関の2箇所の下水管(汚水・本管排水)より3回/3ヶ月間, 計6試料を採取した。mSuper CARBA(関東化学)及びマッコニー培地(含IPM 1 µg/mL)の発育コロニーを対象に, mCIMやCIMTrisによるカルバペネマーゼ検出, 分子学的特性解析を行った。MIC測定には微量液体希釈法を用いた。プラスミドの形質転換実験には*Escherichia coli* DH10Bを用いた。

【結果と考察】GES型カルバペネマーゼ産生菌は6菌種で検出され, GES-24産生菌が*Klebsiella pneumoniae* (ST4444, ST1770, ST12/K35), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (ST526), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (ST4445)及び*Enterobacter kobei* (ST910), GES-5産生菌が*E. roggenkampii* (ST963)及び*Pseudomonas aeruginosa* (ST3364/O6)であった(表)。特にGES-24産生菌の*K. pneumoniae* ST4444, *K. quasi* subsp. *quasi* ST526/K28, *K. quasi* subsp. *simili* ST4445/K14, *E. kobei* ST910及びGES-5産生菌の*E. roggenkampii* ST963が汚水や本管排水より複数回継続して検出され注目された。GES型産生菌に対するIPMのMICは, GES-24産生菌の*K. quasi* subsp. *quasi* ST526/K28と*Klebsiella pneumoniae* ST12/K35 (1-2 µg/mL)を除いて4->8 µg/mLであった。*E. coli* DH10Bにこれらの*bla*_{GES-24}, *bla*_{GES-5}プラスミド(18~37 kb)を導入後得られた形質転換株ではIPMのMICの上昇(0.5-2 µg/mL)が確認された。また, *K. quasi* subsp. *simili* ST4445/K14及び*K. pneumoniae* ST12/K35は*bla*_{GES-24}保有プラスミドに加え, 国内で報告のない*bla*_{VEB-1} ESBL遺伝子保有プラスミド(21.5~22 kb)も保有していた。これらのGES-24・VEB-1同時産生菌がmCIM法で陽性を示したのに対してGES-5, GES-24単独産生菌は陰性であった。

GES型カルバペネマーゼ産生菌の中にはカルバペネム系薬剤のMICが耐性のブレイクポイントを下回ったり, mCIM法で陰性となる場合があり, これらの知見のみでは見逃される可能性があることに留意する必要がある。本報では複数菌種が保有する*bla*_{GES-24}や*bla*_{GES-5}は各々異なる骨格を持つプラスミドに担われていた。これらの菌がすべてヒト由来なのか, あるいは薬剤耐性遺伝子のリザーバー及び多様化・組換えの潜在的なhot spotとなり得る下水環境中で出現したものなのかについては不明である。しかしながら, 岐阜県の下水処理場流入水からもGES型カルバペネマーゼ産生菌が高頻度に検出されており, ヒトに潜在している可能性も考えられる。

表 岐阜県内医療機関の下水における複数回の薬剤耐性菌調査で検出されたGES型カルバペネマーゼ産生菌

検出菌	Sequence type	カルバペネマーゼ遺伝子	ESBL遺伝子	2019/6		2019/7		2019/8	
				汚水排水	本管排水	汚水排水	本管排水	汚水排水	本管排水
<i>K. pneumoniae</i>	4444				●	●	●		●
	1770	GES-24		●					
	12		VEB-1				●		
<i>K. quasi</i> subsp. <i>quasi</i>	526	GES-24		●		●			
<i>K. quasi</i> subsp. <i>simili</i>	4445	GES-24	VEB-1				●	●	●
<i>E. kobei</i>	910	GES-24			●	●	●	●	●
<i>E. roggenkampii</i>	963	GES-5			●	●	●	●	
<i>P. aeruginosa</i>	3364	GES-5							●

病院下水環境に認められた *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-24} 及び *bla*_{GES-24/bla}_{VEB-1} 保有プラスミドの特性解析

林航¹, 曾我英司^{2,3}, 飯村将樹³, 泉克俊³, 吉田諭史³, 于連升⁴, 鹿山鎮男⁴,
菅井基行⁴, 長野由紀子⁵, 長野則之^{1,3}

¹信州大学大学院 総合医理工学研究科,²総合病院中津川市民病院 検査科,
³信州大学大学院 医学系研究科,⁴国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター,
⁵修文大学医療科学部 臨床検査学科

【目的】本報では先の演題で報告した病院下水由来 GES-5, GES-24 及び GES-24/VEB-1 産生菌が保有するプラスミドの特性解析知見を報告する。

【材料と方法】岐阜県内医療機関の下水試料から検出された GES-5 産生 *E. roggenkampii* (ST963), *Pseudomonas aeruginosa* (ST3364/O6), GES-24 産生 *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (ST526/K28), *Enterobacter kobei* (ST910) 及び GES-24/VEB-1 産生 *Klebsiella pneumoniae* (ST12/K35), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (ST4445/K14) の計 6 株を対象に全ゲノム解析 (NovaSeq and/or MinION) を行った。

【結果と考察】*bla*_{GES-5} 及び *bla*_{GES-24} はそれぞれ異なるプラスミド上に存在していたが、6 株中 4 株でクラス 3 インテグロン、残りの 2 株でクラス 1 インテグロンに担われていた。これらインテグロン内の *bla*_{GES-5} や *bla*_{GES-24} とその他の薬剤耐性遺伝子カセット (*aacA4*, *aac(6)-Ia*, *sul1*, *catB3*) の組み合わせは株間で多様であり、*bla*_{GES-24} 保有 3 株でインテグラーゼ遺伝子 *intI3* または *intI1* の下流に *bla*_{GES-24} が 2 コピー連結して存在していたことが注目された。*K. quasi* subsp. *quasipneumoniae* では *bla*_{GES-24} が担われる Tn402-like クラス 3 インテグロンが Col プラスミド pmSO1-GES24 (31,970 bp) 上に存在していた。本プラスミドには下水・水生生物由来 *Aeromonas* spp. で登録されているプラスミド骨格配列も確認された。*E. kobei* の場合も *bla*_{GES-24} は *klebicin B* プラスミド pIPM1H4-GES24 (18,031 bp) 上の Tn402-like クラス 3 インテグロンに担われていた。GES-5 産生 *E. roggenkampii* や *P. aeruginosa* が保有するプラスミド pIPM1H6-GES5, pIPM3H3-GES5 についても、それぞれ環境や下水汚泥に生息する *Achromobacter xylosoxidans* や *Acidovorax* sp. / *Alicyclophilius denitrificans* 起源のプラスミド骨格への *bla*_{GES-5} 保有 Tn402-like クラス 1 or 3 インテグロンの転移が示唆された。また、*E. roggenkampii* が保有するプラスミド性キノロン耐性遺伝子 *qnrS2* を担う IncQ-3 プラスミド (7,212 bp) の全塩基配列は河川・水生生物由来 *Aeromonas* spp. の登録プラスミドの全塩基配列と 99.9% の配列類似性を示した。本研究では我々の知り得る限り国内で初めて *bla*_{VEB-1} ESBL 遺伝子が GES-24 産生 *K. quasi* subsp. *similipneumoniae* 及び *K. pneumoniae* で認められた。*K. quasi* subsp. *similipneumoniae* が保有する *bla*_{VEB-1} はプラスミド pmS2H7VEB-1 (22,029 bp) 上のクラス 1 インテグロン構造内に *qnrVC*, *aacA4*, *aadB*, *dfiA14* と共に担われていた。興味深いことに同時期に検出された *K. pneumoniae* が保有する *bla*_{VEB-1} が担われるプラスミド pmS2H5VEB-1 (21,462 bp) は、*dfiA14* を含む 567bp の遺伝子カセット領域を除き pmS2H7VEB-1 の全塩基配列と 100% 一致していたことから、下水環境中における本プラスミドの水平伝播が示唆された。さらに *P. aeruginosa* を除く 5 株においてカルバペネム耐性に関与する外膜ポーリン蛋白の構造遺伝子 (*ompk35*, *ompF*, *ompC*) 内への IS 挿入 (IS1X4, ISPpu12) による破壊や停止コドンの出現が認められた。

本研究で病院下水がプラスミド及びインテグロンなどの可動性遺伝因子のリザーバーとしての役割を担うと同時に、カルバペネマーゼ遺伝子を含む薬剤耐性遺伝子の集積・拡散の hot spot として深く関与している可能性が強く示唆された。医療関連感染のリスクの観点から、病院下水環境における薬剤耐性菌に今後注視・監視していく必要がある。

メロペネム耐性, イミペネム感性・家禽病原性大腸菌 (APEC) 関連病原遺伝子保有 *Escherichia coli* 臨床分離株の解析

吉田諭史¹, 林航², 手塚佳子³, 飯村将樹¹, 泉克俊¹, 長野由紀子⁴, 長野則之^{1,2}

¹信州大学大学院 医学系研究科, ²信州大学大学院 総合医理工学研究科

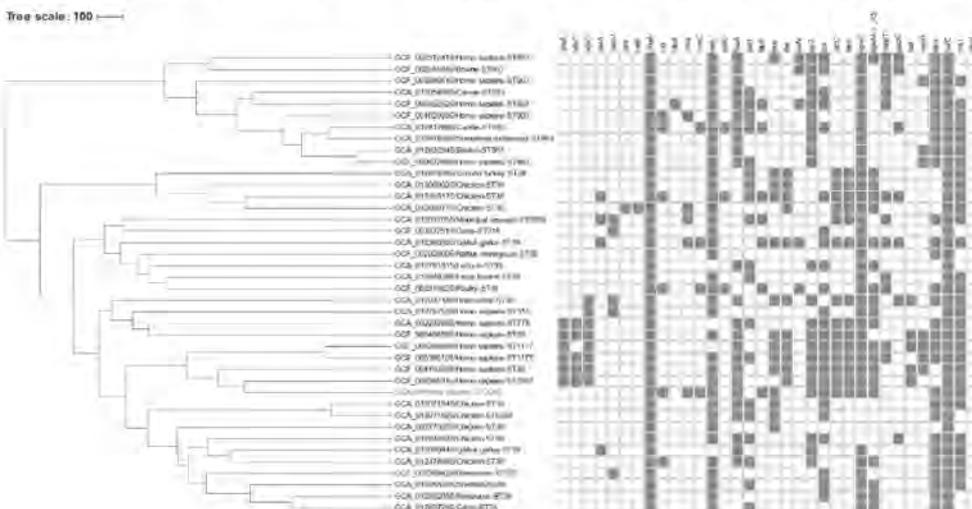
³松本市医師会臨床検査センター, ⁴修文大学医療科学部 臨床検査学科

【目的】カルバペネム耐性腸内細菌目細菌の鑑別は医療関連感染対策上重要であり, 日常検査では種々表現型試験により耐性酵素の推定を行う。本報では表現型試験で判定に苦慮したメロペネム (MEPM) 耐性, イミペネム (IPM) 感性 *Escherichia coli* について報告する。

【材料と方法】70歳代入院患者の喀痰由来 *E. coli* を対象に各種表現型試験, WGS 解析を実施した。

【結果と考察】*E. coli* SU2004 は MEPM 耐性 (MIC 8 µg/mL), IPM 感性 (MIC 1 µg/mL) で, さらにその他のβ-ラクタム系薬, ゲンタマイシン, キノロン系薬, ST 合剤に耐性であった。DDST で不規則な拡張帯が認められたが, AmpC/ESBL 鑑別ディスクでは ESBL 産生性を確認できなかった。また, mCIM 陰性でカルバペネマーゼ鑑別ディスク Plus は判定不能であった。本菌は D-O1:H15-ST2003(CC38)-*fimH65* クローンと同定され, 薬剤耐性遺伝子として既知のカルバペネマーゼ遺伝子は認められず, *bla*_{CTX-M-55} (IS26- Δ ISEcp1-*bla*_{CTX-M-55}-orf477- Δ *bla*_{TEM}-IS26) が型別不能のプラスミド上に確認された。その他 aminoglycoside O-phosphotransferase をコードする *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *aph(3'')-IIa*, *aph(3)-IIa*, スルホンアミド耐性遺伝子 *sul2*, テトラサイクリン耐性に関与する *tet(A)* が存在していた。また, GyrA 及び ParC のキノロン耐性決定領域にそれぞれ S83L, D87N 及び S80I のアミノ酸置換を有していた。さらに, 外膜タンパク質 OmpF 及び AcrAB-TolC 多剤排出ポンプの負の調節遺伝子 *acrR* に塩基の欠失によるナンセンス変異を認めたことから, MEPM 耐性には複合的なメカニズムの関与が示唆された。ゲノムデータベースより取得のヒトとそれ以外の食用動物や環境などに由来する CC38 クローンを加えた whole-genome MLST 及び保有病原遺伝子解析の結果を図に示す。本菌はヒト由来株とクラスターを形成し, 腸管外病原性大腸菌/尿路病原性大腸菌に分類された。さらに多くの家禽病原性大腸菌 (Avian pathogenic *Escherichia coli*) や新生児髄膜炎起因大腸菌 (Neonatal meningitis *Escherichia coli*) 関連病原遺伝子を保有していたが, 加えて同クラスター内の他のヒト由来株には認められない *cia*, *cvaC*, *cma*, *hlyF* を保有していたことが注目された。

本菌は ESBL 産生腸管外病原性大腸菌の間で世界的な広がりを見せている主要クローン CC38 に属し, 家畜, 食肉由来 ESBL 産生株に高頻度にみられる CTX-M-55 産生株であった。また, ヒト由来株には認められず家禽に特徴的ないくつかの APEC 関連病原因子遺伝子を保有していたことから, 起源として家畜などが疑われる。



医療施設で分離されたカルバペネム耐性 *Pseudomonas putida* グループ菌株の分類と分子疫学解析

○遠矢真理¹、多田達哉¹、霜島正浩^{2,3}、寺本華奈江⁴、小川美保²、上地幸平⁵、前田士郎⁵、San Mya⁶、Htay Htay Tin⁶、藤田次郎⁷、切替照雄¹

¹順天堂大学大学院医学研究科微生物、²株式会社ビー・エム・エル、³株式会社スギヤマゲン、⁴株式会社島津製作所、⁵琉球大学医学部附属病院検査・輸血部、⁶National Health Laboratory、⁷琉球大学医学部附属病院

【目的】*Pseudomonas* 属の菌種は現在 216 種が報告されており、系統分類学的に 13 グループに分類される。次世代シーケンス技術の発展により、菌株の全ゲノム情報を容易に決定できるようになってきた。*P. putida* グループは 20 種類の菌種が知られている。この内 6 菌種はヒト臨床検体から分離されているが、その多くは *P. putida* として同定されている。これらの臨床分離株の中にはカルバペネム耐性菌も報告され、正確な菌種同定が必要となってきた。本研究の目的は、全ゲノム情報に基づき、*P. putida* 臨床分離株の菌種を再同定し、分子疫学解析を実施することである。このために、2 種類の次世代シーケンス解析技術、ショートリードの MiSeq 及びロングリードの MinION を組み合わせて利用し、解析を行った。

【方法】日本・ミャンマーの医療施設で分離され、菌種同定機器で *P. putida* と同定された菌株を収集した。各菌株から DNA を抽出し、次世代シーケンサー (MiSeq、MinION) で全ゲノム配列を決定した。全ゲノム配列を用いた average nucleotide identity (ANI) と digital DNA-DNA hybridization (dDDH) による *in silico* 解析により菌種同定を行った。さらに新菌種として同定された菌株については、API 20NE、API ZYM および Biolog GENIII で生化学的性状試験、および MALDI-MS を用いたタンパク質解析を行い、近縁菌種と比較した。

【結果】*P. putida* と同定された計 21 菌株 (日本株: 7 株、ミャンマー株: 14 株) のうち、全ゲノム配列情報から *P. putida* と再同定された菌株は 0 株、他の既存菌種と同定された菌株は 7 株 (33%)、いずれの既存菌種にも同定されなかった菌株は 14 株 (67%) であった。既存菌種の 7 株は、*P. mosselii*: 4 株、*P. fulva*: 1 株、*P. mendocina*: 1 株、*Stenotrophomonas maltophilia*: 1 株であった。既存菌種に分類できなかった 14 株 (日本株: 3 株、ミャンマー株: 11 株) の ANI 及び dDDH 解析を行った結果、10 株 (日本株: 2 株、ミャンマー株: 8 株) は同一の新菌種で *P. asiatica* sp. nov.、2 株 (日本株: 1 株、ミャンマー株: 1 株) は新菌種 *P. juntendi* sp. nov.、残りの 2 株は新菌種 *P. yangonensis* sp. nov. であった。ミャンマー由来の新菌種 *P. asiatica* 8 株について、微量液体希釈法で薬剤感受性試験を実施し、全ゲノム配列を用いて薬剤耐性遺伝子の検索を行ったところ、2 種類のメタロβラクタマーゼ遺伝子 (*bla_{NDM-1}*、*bla_{VIM-2}*)、6 種類の ESBL 遺伝子、16S rRNA メチラーゼ遺伝子 *rmlC* が検出された。アミノグリコシド修飾酵素遺伝子は合計 16 種類が検出され、それぞれ 1-7 種類保有していた。キノロン耐性関与する *gyrA* と *parC* 変異は全 8 株で検出された。*P. putida* と同定された株は、このグループの他菌種に加え、新菌種が含まれていた。さらに我々が発見した新菌種の *P. asiatica* は既に多くの薬剤耐性因子を獲得し、多剤耐性菌として臨床的に重要であることが示唆された。

大阪府内で分離された mCIM 陽性 *Enterobacter cloacae* complex 株の解析

大阪健康安全基盤研究所

河原隆二、山口貴弘、安達史恵、安楽正輝、川津健太郎

国内の医療機関で検出されるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌のうち、*Enterobacter cloacae* complex (以下、ECC) は *Klebsiella aerogenes* について報告頻度の高い菌種である。本研究では、大阪府内で検出されたカルバペネム耐性 ECC (以下、CR-ECC) で mCIM 陽性を示したものについて解析を行ったので報告する。

【方法】 2017 年以降に大阪府内の医療機関で CRE と判定され、当研究所で検査を行った ECC 62 株 (うち届出対象 54 株、大規模アウトブレイク事例のぞく) を対象とした。これらについて、菌種同定、薬剤感受性試験、薬剤耐性鑑別試験、mCIM、マルチプレックス PCR によるカルバペネマーゼ (NDM, KPC, IMP, VIM, OXA-48, GES 型)、ESBL、AmpC のスクリーニングを行った。mCIM 陽性を示し、カルバペネマーゼ遺伝子がスクリーニングで検出されなかった株については、さらに PCR やゲノム解析による耐性遺伝子の検索を行った。

【結果】 対象とした株のうち、mCIM で陽性となったのは 8 株で、このうちメタロ-β-ラクタマーゼ産生株は 5 株であった。これらはすべて IMP 型遺伝子陽性となり、その内訳は *bla*_{IMP-1} (3 株)、*bla*_{IMP-6} (2 株) であった。残る 3 株については、カルバペネマーゼ遺伝子が検出できなかったため、さらに PCR による耐性遺伝子の検索を行ったところ、2 株からそれぞれ *bla*_{IMI-1}、FRI 型のカルバペネマーゼ遺伝子が検出された。この FRI 型遺伝子は、シーケンス解析の結果から、*bla*_{FRI-9} として新たに登録されることとなった。さらに、いずれの遺伝子も検出できなかった 1 株について、ゲノムシーケンスによるカルバペネマーゼ遺伝子の検出を試みた。染色体上に AmpC の 1 種である *bla*_{ACT-28} が存在したものの、その他にカルバペネマーゼ遺伝子と推測されるものは見つからなかった。ACT-28 産生株は、欧米で mCIM⁺ 偽陽性を示し、特に *E. kobei* ST125 から特異的に見つかることと報告されている。当該菌株の MLST 型は ST125 であり、この報告と同様に ACT-28 を産生することにより mCIM⁺ 偽陽性を示したことが示唆された。

【考察】 現在のところ、大阪府内で検出される CR-ECC のうち、mCIM 陽性株は少なかった (12.9%)。これらからは、日本の CPE で多く報告される IMP 型が検出された一方で、IMI や FRI 型といったまれなカルバペネマーゼや、ACT-28 産生株も存在することが明らかとなった。現在、こういった希少なタイプを検出するためのマルチプレックス PCR のプロトタイプを構築中であり、今後その性能などについて検証を進めていきたい。

日本の医療施設で分離されたカルバペネム耐性 *Providencia* spp. の細菌学的・遺伝学的特性

○岩田秀¹、多田達哉¹、菱沼知美¹、遠矢真理¹、栞原京子¹、大城聡¹、小川美保²、霜島正浩²、切替照雄¹

¹順天堂大学医学部微生物学講座

²BML Inc., 川越、埼玉、日本

【背景】

カルバペネム耐性グラム陰性菌の伝播・拡大が公衆衛生上大きな問題となっている。*Providencia* spp. は腸内細菌科細菌に属し、日和見感染及び尿路感染の原因である。カルバペネム耐性 *Providencia* spp. が日本で尿検体から分離されたので報告する。

【材料と方法】

2018年、大阪府、埼玉県及び高知県の3医療施設でカテーテル尿または尿検体から分離されたカルバペネム耐性 *Providencia rettgeri* 3株および *Providencia stuartii* 2株、計5株を用いた。薬剤感受性試験及び次世代シーケンシング (Miseq および MinION) による全ゲノム解析を行った。得られたデータから ResFinder を基に薬剤耐性遺伝子を同定した。IMPの加水分解活性を測定した。IMPメタロ-β-ラクタマーゼ発現量をウエスタンブロットで比較した。

【結果及び考察】

解析した5つの分離株はイミペネムおよびメロペネムに対して耐性であった。そのうち、3株はカルバペネムの最小阻害濃度が 512 μg/ml であった。全ゲノム解析から、これらの3株のうち、2株は 204kb プラスミド、1株は 152kb プラスミドに *bla*_{IMP-70} を保持していた。残りの2株のうち、1株は 84kb プラスミドに *bla*_{IMP-11} を、もう1株は染色体に *bla*_{IMP-1} を2コピー保持していた。

IMP-1と比較すると、IMP-70は Val67Phe 及び Phe87Val の2か所のアミノ酸置換がある。それぞれのアミノ酸置換酵素活性を比較するため、IMP-1、IMP-1変異体 (Val67Phe)、IMP-1変異体 (Phe87Val) 及びIMP-70のリコンビナントタンパクを精製し、その加水分解活性を調べた。その結果IMP-1と比較して、IMP-1変異体 (Val67Phe) 及びIMP-70はメロペネムに対して有意に高い加水分解活性を持っていた。このことからアミノ酸置換 (Val67Phe) がカルバペネム高度耐性を示すことが示唆された。ウエスタンブロットでは、染色体上に *bla*_{IMP-1} を2コピー有する株のIMP発現量が他の4株と比較して多かった。

これらの結果は *Providencia* spp. が *bla*_{IMP-1} を2コピー獲得するか、もしくは *bla*_{IMP} のアミノ酸置換を起こす変異によってより高度なカルバペネム耐性を獲得していることが示唆された。

Iwata *et al.* 2020. Emergence of carbapenem-resistant *Providencia rettgeri* and *Providencia stuartii* producing IMP-type metallo-β-lactamase in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.*

日本の医療施設で分離された VIM 型カルバペネマーゼ産生 MDRP の分子疫学解析

○菱沼知美¹、多田達哉¹、遠矢真理¹、霜島正浩^{2,3}、切替照雄¹

¹順天堂大学大学院医学研究科微生物学

²株式会社ビー・エム・エル

³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大きな問題となっている。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 β-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。本研究では、2012 年以降に日本で分離された VIM 型 MBL 産生カルバペネム耐性緑膿菌臨床株の分子疫学解析を実施するとともに新たに同定された VIM-60 の生化学的性状を解析した。

【方法】2012 年から 2018 年に日本で分離されたカルバペネム耐性緑膿菌 1860 株を対象とした。微量液体希釈法により薬剤感受性試験を実施し、PCR により *bla*_{VIMs} 遺伝子を保有する株をスクリーニングした。VIM 型 MBL 産生緑膿菌の全ゲノムをシーケンスし、PAOI をリファレンスにして系統樹解析を実施した。VIM-60 および VIM-66 はその遺伝子を大腸菌にクローニングし、各種 β-ラクタム剤に対する薬剤感受性試験を実施した。その内、VIM-60 に関してはリコンビナントタンパクを精製し、同薬剤に対する酵素活性を測定した。

【結果と考察】カルバペネム耐性緑膿菌 1860 株中、25 株 (1.3%) が VIM 型産生菌であった。VIM 型産生緑膿菌の分離率は 2012 年が 0.3%、2013 年が 1.1%、2014 年が 0.7%、2015 年が 1.7%、2016 年が 1.4%、2017 年が 2.4% および 2018 年が 3.0% と近年増加傾向が見られた。これら 25 株の VIM 遺伝子の配列を調べたところ、VIM-1 (7 株)、VIM-2 (7 株)、VIM-24 (4 株) および新規バリエーション VIM-60 (4 株) と VIM-66 (3 株) を同定した。VIM-2 と比較して、VIM-60 は 2 つのアミノ酸置換 (Arg228Leu, His252Arg) があり、VIM-66 は 3 つのアミノ酸置換 (Ser141Leu, Arg228Leu, His252Arg) があった。地域別に調査したところ、青森 (1 株)、岩手 (2 株)、石川 (2 株)、静岡 (1 株)、三重 (1 株)、大阪 (6 株)、愛媛 (11 株) および宮崎県 (1 株) の医療施設から分離されていた。MLST 解析の結果、VIM 型産生株は ST1816 (11 株)、ST179 (1 株)、ST235 (11 株) および ST233 (2 株) に属していた。分子系統解析の結果、VIM 型産生緑膿菌は大きく 2 つの Clade に分かれた。Clade A は ST1816 に属した株、Clade B は ST235 に属した株だった。VIM-60 および VIM-66 を発現させた大腸菌は VIM-2 を発現させた大腸菌に比べ、cefepime、cefazopran、cefpirome および ceftazidime に対する MICs が有意に高かった。VIM-60 の酵素活性は VIM-2 と比較すると、cefepime、cefazopran および cefpirome に対する活性が大きく上昇していた。また VIM-60 と VIM-66 は同じ地域から分離され、約 60kbp の同サイズのプラスミドに存在していることが明らかとなった。

本研究により、VIM 型 MBL を産生するカルバペネム耐性緑膿菌の分離率が増加し、さらに特定の地域で分離された緑膿菌が保有しているプラスミド由来 *bla*_{VIM} 遺伝子が短時間で変異を起こし、進化していることが示唆された。

