

第 50 回薬剤耐性菌研究会プログラム

2021 年 11 月 12 日 (金)

12:55～17:00

12:55～13:00

開会の挨拶

一般演題：発表 12 分、討論 3 分

13:00～13:45

座長：原田 哲也(大阪健康安全基盤研究所)

VRE

VanD 型バンコマイシン耐性遺伝子群保有 genomic island の宿主多様性に関する分子疫学解析

○橋本佑輔¹，久恒順三²，鈴木仁人²，野村隆浩¹，久留島潤¹，平川秀忠¹，
谷本弘一³，菅井基行²，富田治芳^{1,3}

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

VanD 型バンコマイシン耐性 *Enterococcus faecalis* の分子疫学的解析

○三村健介¹，橋本佑輔¹，野村隆浩¹，久留島潤¹，平川秀忠¹，谷本弘一²，
村谷哲郎³，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ひびき AMR 研究会)

大阪府における VRE 感染症の現状と分離株の解析

○原田哲也¹，梅川奈央¹，中村寛海¹，河原隆二¹，川津健太郎¹，久恒順三²，
沓野祥子²，松井真理²，鈴木里和²，菅井基行²

(¹大阪健康安全基盤研究所，²国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター)

13:45～14:45

座長：平川 秀忠(群馬大学)

グラム陽性菌

大阪府で分離された PVL 陽性 MRSA の分子疫学的解析

○安楽正輝，河原隆二，山口貴弘，若林友騎，川津健太郎

(大阪健康安全基盤研究所 微生物部細菌課)

国内の血流感染症由来ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌の解析

○小出将太^{1,2}, 林航¹, 吉田諭史³, 泉克俊³, 瀧澤志野³, 坂口かなえ³, 曾我英司³, 木村幸司⁴, 荒川宜親⁵, 長野由紀子⁶, 長野則之^{1,3,6}

(¹信州大学大学院 総合医理工学研究科, ²長野県立こども病院, ³信州大学大学院 医学系研究科, ⁴名古屋大学大学院 医学系研究科, ⁵修文大学 医療科学部, ⁶信州大学学術研究院 保健学系)

疫学解析

IncF プラスミド POT 法開発のための検出 ORF 候補検索の検討

○鈴木匡弘, 土井洋平

(藤田医科大学医学部微生物学講座)

ORF 系統樹を利用したアウトブレイク解析

○林謙吾¹, 鈴木匡弘¹, 土井洋平^{1,2}

(¹藤田医科大学医学部微生物学講座, ²藤田医科大学医学部感染症科)

~☕☕ coffee break 14:45~15:00 ~☕☕

15:00~ 15:45

座長: 鈴木 匡弘 (藤田医科大学)

薬剤耐性(1)

腸内細菌科細菌の tunicamycin resistance protein は aminoglycoside

3-N-acetyltransferase と強く関連する

○津田裕介¹, 和知野純一^{1,2}, 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)

抗酸菌はなぜ抗菌薬が効きにくいのか? 抗酸菌内因性薬剤耐性機構の網羅的解析

○港雄介

(藤田医科大学医学部 微生物学講座)

マクロ孔型の多孔質炭素を利用した腸管出血性大腸菌の志賀毒素と 3 型分泌蛋白質の吸着による病原性抑制

○平川秀忠¹, 鈴江一友³, 滝田綾子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)

～☺☺ coffee break 15:45～16:00 ☺☺～

16:00 ～

特別講演

座長：切替 照雄（順天堂大学大学院医学研究科）

バイオフィルムは細胞不均一性・ 自然突然変異株を生む場である

野村 暢彦

筑波大学 生命環境系 教授

微生物サステナビリティ研究センター 副センター長

JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 研究総括

JST ACT-X 環境とバイオテクノロジー領域 研究総括

2 日目

2021 年 11 月 13 日 (土)

9:00~11:50

9:00~9:15 会務報告

一般演題：発表 12 分、討論 3 分

9:15~10:00

座長：法月 千尋(名古屋大学/公立陶生病院)

薬剤耐性(2)

愛玩動物臨床材料由来 *Pseudomonas aeruginosa* における III 型分泌系毒素遺伝子
exoU 保有 international high-risk clone ST235 の出現と広がり

○瀧澤志野¹、坂口かなえ¹、林航²、泉克俊¹、吉田諭史¹、曾我英司¹、小出将太²、伊從慶太³、蓑島健一³、高野慎也⁴、北川真喜⁴、長野由紀子⁵、長野則之^{1,2,5}

(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信州大学学術研究院 保健学系)

国産食肉からの薬剤耐性菌の分離状況とゲノム解析について

○山口貴弘¹、河原隆二¹、原田哲也¹、若林友騎¹、中村昇太²、元岡大祐²、
松本悠希²、中山達哉³、山本容正⁴、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大阪大学 微生物病研究所
³広島大学大学院総合生命科学研究科 ⁴岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科)

ネパールの医療施設で分離された高度コリスチン耐性 *Aeromonas jandaei* のゲノム特性

○米田智樹¹、多田達哉^{1,2}、Jeevan B. Sherchand³、切替照雄^{1,2}

(¹順天堂大学医学部微生物学講座,²順天堂大学大学院医学研究科微生物学,³トリ
ブバン大学医学部微生物学教室)

~☕☕ coffee break 10:00~10:15 ~☕☕

10:15~11:00

座長：多田 達哉(順天堂大学)

ESBL/カルバペネマーゼ

CTX-M 型 ESBL 産生腸内細菌目細菌を迅速に検出するウサギモノクローナル抗体を
用いたラテラルフローイムノアッセイ法

○西田智¹、中川真隆²、芥照夫²、丸山俊昭³、吉野友祐¹、斧康雄^{1,4}

(¹帝京大学医学部微生物学講座,²極東製薬工業株式会社研究開発部門研究部,
³Abwiz Bio Inc.,⁴帝京平成大学健康メディカル学部)

市中下水におけるカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌の経時的疫学調査; *bla*_{GESs} 遺伝子及び保有菌種の多様性

○林航¹, 瀧澤志野², 坂口かなえ², 泉克俊², 吉田諭史², 于連升³, 鹿山鎮男³, 菅原庸³, 菅井基行³, 長野由紀子⁴, 長野則之^{1,2,4}

(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国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター, ⁴信州大学学術研究院 保健学系)

医療施設下水における ESBL 産生 *Escherichia coli* およびカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌の経時的変遷

○坂口かなえ¹, 加地大樹², 瀧澤志野¹, 林航³, 泉克俊¹, 吉田諭史¹, 于連升⁴, 鹿山鎮男⁴, 菅原庸⁴, 菅井基行⁴, 長野由紀子⁵, 長野則之^{1,3,5}

(¹信州大学大学院 医学系研究科, ²国保君津中央病院 臨床検査科, 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信州大学学術研究院 保健学系)

11:00~11:45

座長: 林 航(信州大学)

同一患者由来、長期保菌後の尿路病原性大腸菌 ST405 から検出された一塩基多型

○綿引正則¹, 内田薫^{1*}, 中村雅彦¹, 金谷潤一¹, 磯部順子¹, 木全恵子¹, 大石和徳¹, 高本恭子², 佐々木一成², 高橋慎太郎², 得田和彦²

(¹富山県衛生研究所細菌部 (*現富山県高岡厚生センター), ²富山労災病院)

Practical Agar-Based Disk Diffusion Tests Using Sulfamoyl Heteroarylcarboxylic Acids for Identification of Subclass B1 Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacterales*

○法月千尋^{1,2}, 和知野純一^{1,5}, 金万春¹, 木村幸司¹, 川村久美子³, 長野則之⁴, 荒川宜親⁵

(¹名古屋大学大学院・医学系研究科・分子病原細菌学, ²公立陶生病院 臨床検査部, ³名古屋大学大学院・医学系研究科・オミックス医療科学, ⁴信州大学大学院 総合医理工学研究科 医学系専攻, ⁵修文大学 医療科学部 臨床検査学科)

日本の医療施設で分離された ST1816 に属する VIM 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生緑膿菌のプラスミド解析

○菱沼知美¹, 多田達哉¹, 遠矢真理¹, 大城聡¹, 小川美保², 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)

11:45～

閉会の挨拶

11月12日（金）16:00～

特別講演 抄録

バイオフィルムは細胞不均一性・
自然突然変異株を生む場である

野村 暢彦

筑波大学 生命環境系 教授

微生物サステナビリティ研究センター 副センター長

JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 研究総括

JST ACT-X 環境とバイオテクノロジー領域 研究総括

バイオフィルムは細胞不均一性・自然突然変異株を生む場である

野村暢彦

筑波大学 生命環境系 教授

微生物サステナビリティ研究センター 副センター長

JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト 研究総括

JST ACT-X 環境とバイオテクノロジー領域 研究総括

Email: nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp

新型コロナウイルス感染症が、人々の日々の生活そして経済まで多大な影響を与えたことにより、微生物への関心が高まっている。微生物は、その様な感染症のみならず、健康・食・環境全てに広くかかわり、SDGsの多くの項目の達成にも関与している。よって、21世紀は健康・食・環境にかかわる微生物制御が人類の重要な課題の一つと言っても過言ではない。単細胞の微生物は、地球上ではいつも一匹でふらふらと自由生活をおくっているように考えられていたが、しかし、近年、それら微生物は、会話し、群れて集団（バイオフィルム）になり微生物社会を形成していることが明らかになってきた。興味深いことに、微生物の集団バイオフィルムも環境に適応して柔軟に変化することもわかってきた(1)。そして、バイオフィルムの中では、微生物の様々なコミュニケーションシステムを介した微生物社会が形成されていることが明らかになってきた(2-4)。また、バイオフィルム内では細胞の不均一性さらには多様性が生み出されており、まるでバイオフィルム自体が一つの生命多様性発生装置のように振る舞っているように思える。このような微生物社会と植物・動物の関係の理解は、感染症や腸内細菌などの研究においてもますます重要となるであろう(5)。本講演では、そのような微生物社会とそれを解析するための最新イメージング解析技術もあわせて紹介させていただく(6)。

- 1) Obana N., *et al.* (2020) **NPJ Biofilms and Microbiomes** 6.
- 2) Turnbull L., Toyofuku M., *et al.* (2016) **Nature Communications** 7.
- 3) Toyofuku M., *et al.* (2017) **Nature Communications** 8.
- 4) Toyofuku M., Nomura N., Eberl, L. (2019) **Nature Reviews Microbiology** 17.
- 5) Obana N., *et al.* (2017) **Infection and Immunity** 85.
- 6) Yawata Y., *et al.*, (2019) **Applied and Environmental Microbiology** 85.

一般演題抄録

VanD 型バンコマイシン耐性遺伝子群保有 genomic island の宿主多様性に関する分子疫学解析

○橋本 佑輔¹、久恒 順三²、鈴木 仁人²、野村 隆浩¹、久留島 潤¹、平川 秀忠¹、
谷本 弘一³、菅井 基行²、富田 治芳^{1,3}

¹群馬大 院医 細菌学、²国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター、

³群馬大 院医 薬剤耐性菌実験施設)

【緒言】

バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の耐性型のうち、VanD 型 VRE は全世界での報告が数十例程度と極めて稀なバンコマイシン(VAN)耐性型である。バンコマイシン耐性に関わる *vanD* 耐性遺伝子群は genomic island として腸球菌の染色体上へ挿入されていることが知られているが、その宿主多様性については不明な点が多い。今回、国内医療機関より検出された VanD 型 *E. faecium* 3 株の分子生物学的解析、並びに全ゲノム解析による VanD 型 VAN 耐性遺伝子群を保有した genomic island の分子疫学解析を実施したので報告する。

【方法・方法・結果】

国内医療機関の入院患者一名の尿検体より 1 株 (AA620)、便検体より 2 株 (AA622/624) の VanD 型 *E. faecium* を得た。本患者には、VAN を含め複数の抗菌薬の長期投与歴が存在した。MLST/PFGE 解析からこれらの株は同一の遺伝的背景を持つと考えられたが、VAN の MIC 値はそれぞれ 64 mg/L (AA620)、8 mg/L (AA622/624) と異なっていた。ゲノム解析と qRT-PCR 解析の結果、AA622/AA624 では VanD 型 VAN 耐性遺伝子群を 2 セット保有していることが判明した。また AA620 では細胞壁合成酵素 *ddl* 遺伝子変異を認め、これが VAN 高度耐性化に寄与していると考えられた。

また AA620 および AA622/624 の VanD 型 VAN 耐性遺伝子群保有 genomic island はそれぞれ 155kb、185kb のサイズで、いずれも宿主染色体の *lysS* 遺伝子内に挿入されていた。この genomic island の GC 含量は 44.2% と腸球菌ゲノムの GC 含量と比較し高く、外来性に獲得したものと思われた。Public database 検索を行うと、複数の腸管内嫌気性菌が類似の genomic island を保有しており、integration site の多くが *lysS* 遺伝子であった。これら嫌気性菌は Firmicute 門、Clostridia 綱、Eubacteriales 目に属する Lachnospiraceae 科、Oscillospiraceae 科の 2 つの科に属していた。Genomic island のコアゲノムに基づく系統樹解析から、VanD 型 VAN 耐性遺伝子群保有 genomic island は腸管内細菌の間で水平伝播していることが示唆された。

【考察】

抗菌加療の過程で選択されたと考えられる、VAN 耐性度の異なる複数の VanD 型 *E. faecium* を検出した。また VanD 型 VAN 耐性遺伝子群保有 genomic island は腸管内嫌気性菌にて普遍的に維持されており、これらが VAN 耐性遺伝子のリザーバーとして働いている可能性が示唆された。

VanD 型バンコマイシン耐性 *Enterococcus faecalis* の分子疫学的解析

三村健介¹、橋本佑輔¹、野村隆浩¹、久留島潤¹、平川秀忠¹、谷本弘一²、村谷哲郎³、
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ひびき AMR 研究会

【目的】 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薬剤耐性菌で、近年問題となっている。その中で世界的に報告が極めて少ないものに VanD 型 VRE がある。VanD 型 VRE はバンコマイシンに対し高度耐性を示し、これまでに *Enterococcus faecium* に関しては複数の論文報告があるが、*E. faecalis* に関する報告はほとんど無い。今回、我々は国内で分離された VanD 型 VRE (*E. faecalis*) 4 株の分子疫学的解析を行ったので報告する。

【方法】 北九州地域の 3 つの医療機関から SVR2085 (2012 年 A 病院 尿検体)、SVR2281 (2015 年 B 病院 尿検体)、SVR2330 (2017 年 B 病院 尿検体)、および SVR2331 (2018 年 C 病院 便検体) の VanD 型 VRE (*E. faecalis*) が分離された。これら 4 株を解析対象とし、各種抗菌薬の MIC を測定、MLST/PFGE 解析ならびに全ゲノム解析を行った。

【結果】 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) と高度耐性を示し、またゲンタマイシン、メロペネムなど多剤に耐性であった。ST 型は 3 株 (SVR2085、SVR2281、SVR2330) 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 の塩基配列を比較したところ、ST392 型の 3 株は *E. faecium* で報告されている既存の VanD₅ と一致していた。一方、ST4 型の 1 株はこれまで報告されている VanD ligase の分類 (VanD₁-VanD₆) とは異なることから、新たに VanD₇ 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 179-249kb であり、ST392 型の 3 株の genomic island は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 株は既報にみられない genomic island の構造であり、late competence protein Com オペロン内に挿入されていた。

【考察】 今回解析した 4 株の VanD 型 VRE (*E. faecalis*) のうち 1 株は他とは ST 型が異なり、VanD ligase の遺伝子配列や genomic island の構造も大きく異なることから別の由来と考えられた。他の 3 株は同一の起源・由来を持つ近縁株と考えられ、同一起源を持つ VanD 型 VRE (*E. faecalis*) が北九州地域に伝播・拡散している可能性が示唆された。

大阪府における VRE 感染症の現状と分離株の解析

○原田哲也¹、梅川奈央¹、中村寛海¹、河原隆二¹、川津健太郎¹、久恒順三²、沓野祥子²、松井真理²、鈴木里和²、菅井基行²

1. 大阪健康安全基盤研究所、2. 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター

感染症法により五類感染症に位置付けられるバンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin-resistant enterococci ; VRE) 感染症の報告数は、近年、増加傾向にある。大阪府内では、2013 年から 2015 年まで毎年 5 件程度で推移していたが、2016 年から増加に転じ、2017 年には 26 件、2018 年には 24 件、2019 年には 32 件が報告され、全国で最多となった。また、この間、複数の医療機関で院内感染事例も発生した。大阪府では感染症発生動向調査事業の一環として、発生届の対象となった VRE 菌株の試験検査を実施している。また、院内感染が疑われる保菌事例についても、医療機関からの依頼に基づいた菌株解析を実施している。

2016 年 1 月から 2020 年 9 月に大阪府とその近隣県で患者または保菌者より分離された VRE 581 株について、菌種同定とバンコマイシン耐性遺伝子 (*vanA* および *vanB*) の検出を実施した。その結果、*vanA* 保有の VRE が 97.9% (*Enterococcus faecium*; 554 株、*E. avium*; 8 株、*E. raffinosus*; 3 株、*E. casseliflavus*; 2 株、*E. faecalis*; 1 株、*E. gallinarum*; 1 株)、*vanB* 保有の VRE は 2.1% (*E. faecium*; 11 株、*E. faecalis*; 1 株) で、分離株の 95.4% が *vanA* 保有の *E. faecium* であった。

vanA 保有 *E. faecium* の地域内伝播は公衆衛生上の重大な懸念材料となることから、分離株の遺伝学的関連性を明らかにするため、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いた遺伝子型別を実施した。類似度 90% を基準としてクラスタリング解析した結果、554 株は 148 の PFGE 型に分けられ、バリエーションに富んだ PFGE 型が大阪府とその近隣県に広がっていることが明らかとなった。一方、院内感染事例では単一の PFGE 型を示す菌株が優位に分離されていることから、特定の菌株による水平伝播が院内感染の原因であることが推察された。また、同一の PFGE 型を示す菌株が、隣接する複数の医療機関で分離されるケースも散見されることから、周辺地域での VRE 分離状況を把握し、VRE の持ち込みを防ぐことが院内感染の発生防止につながると考えられた。

一定期間に異なる医療機関で分離された PFGE 型の異なる *vanA* 保有 *E. faecium* 8 株について、全ゲノム解析およびサザンハイブリダイゼーションを実施した。その結果、全ての供試株が clonal complex 17 に属し、さらに、7 株が保有する *vanA* プラスミドが近年報告された線状プラスミド pELF2 (108, 102 bp) と高い類似性を示すことが明らかとなった。本プラスミドは接合伝達により菌株間を水平伝播する可能性が高く、本プラスミドの広範な伝播が VRE 感染症増加の一因となっている可能性が示唆された。

大阪府で分離された PVL 陽性 MRSA の分子疫学的解析

○安楽 正輝、河原隆二、山口貴弘、若林友騎、川津健太郎

大阪健康安全基盤研究所 微生物部細菌課

【背景及び目的】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は 1961 年に報告されて以降、代表的な院内感染の原因菌として知られてきた。特に Panton-Valentine leukocidin (PVL) 陽性 MRSA は強毒型の MRSA として知られ、本菌が原因で壊死性肺炎に至った場合の致死率は 75% に達する。本邦において 2009 年に PVL 陽性 MRSA 感染症による死亡例が報告されており、近年、分離の報告例が増えてきている。今後、流行状況を監視する必要がある感染症であると考えられ、当研究所においても医療機関や保健所からの依頼を受けて菌株の収集・解析を行なっている。2014 年以降、PVL 陽性 MRSA として分離された 6 株について、遺伝子解析 (MLST 及び SCC*mec* 型別) やパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 等の手法を用いて分子疫学解析を行ったので報告する。

【方法】

それぞれの菌株については、ドライプレート法による薬剤感受性試験 (MIPIC, CFX, GM, EM, CLDM, MINO, VCM, TEIC, LZD, LVFX, ST) を行った。また、各病原因子の遺伝子 (*pvl*, *tst*, *eta*, *etb*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) の有無については PCR 法により評価した。*pvl* が陽性となった株についてさらに、SCC*mec* 型及び MLST 型を決定し、PFGE の結果と合わせて遺伝的類似性について評価した。

【結果及び考察】

6 株の PVL 陽性 MRSA の遺伝子型は、4 株が欧米を中心に流行している USA300 型の MRSA と同じ遺伝子型である SCC*mec* type IVa, ST8 型で、残り 2 株はそれぞれ SCC*mec* type IVa, ST22 型が 1 株、SCC*mec* type IVc, ST30 型が 1 株であった。*tst* を保有している株は SCC*mec* type IVa, ST22 型の 1 株のみであった。その他の病原因子の遺伝子は陰性であった。さらに、SCC*mec* type IVa, ST8 型の 4 株は、PFGE のパターンも類似していた。このことから、SCC*mec* type IVa, ST8 型は、同系統の菌が大阪府域に定着しており散発的に臨床例が発生しているものと示唆された。一方で、その他に検出された SCC*mec* type IVa, ST22 型、SCC*mec* type IVc, ST30 型の PVL 陽性 MRSA について本邦では報告例が少ない。そこで、より詳細な遺伝的類似性を評価するために、現在、NGS 解析を実施しており、合わせて報告したい。

国内の血流感染症由来ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌の解析

小出将太^{1,2}, 林航¹, 吉田諭史³, 泉克俊³, 瀧澤志野³, 坂口かなえ³, 曾我英司³,
木村幸司⁴, 荒川宜親⁵, 長野由紀子⁶, 長野則之^{1,3,6}

¹信州大学大学院 総合医理工学研究科,²長野県立こども病院,

³信州大学大学院 医学系研究科,⁴名古屋大学大学院 医学系研究科,

⁵修文大学 医療科学部,⁶信州大学学術研究院 保健学系

【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遺伝的特性を報告する。

【材料と方法】2008 年から 2016 年の間に収集された同一医療機関の予後不良事例由来血清型 Ia-ST1 の 4 株 (SU85, SU97, SU187, SU233), 他の 2 施設に由来する血清型 III-ST1 の 2 株 (SF0942, SF1510), 血清型 Ib-ST10 (SF0680) の 1 株, III-ST464 (MRY-081422) の 1 株から成る血液由来多剤耐性 PRGBS 8 株を対象に全ゲノム解析を実施した。さらに米独の PRGBS5 株や、ペニシリン感性 GBS (PSGBS)43 株の登録ゲノム配列を加えた解析を行った。

【結果と考察】ゲノム配列間の OrthoANI に基づく ANI 値は PRGBS 8 株で >98.02%, さらに医療関連感染に関わる Ia-ST1 の 4 株及び他施設の III-ST1 の 2 株の間では 99.00-99.98% であったことが注目される。Ia-ST1 の 4 株中 3 株 (SU85, SU97, SU187) は病原因子遺伝子 *scpB-lmb* と *cfb*, 及び薬剤耐性遺伝子 *mef(A)-msr(D)* を含む 244-kb T4SS-type Integrative Conjugative Elements (ICE) の保有が推定された。残り 1 株 (SU233) も極めて類似性の高い配列の保有が推定されたが、*mef(A)-msr(D)* は認められなかった。III-ST1 の 2 株, Ib-ST10 と III-ST464 の各 1 株は *scpB-lmb* と *cfb* を保有するもののこの ICE の存在は推定されなかった。また, Ia-ST1 の 4 株及び Ib-ST10 の 1 株が Tn916 上に *tet(M)* を保有し, III-ST1 の 1 株 (SF0942) が Tn916-like 上に *tet(M)-erm(B)* を保有していた。PRGBS8 株の pan-genome は 3,531 個の蛋白コード遺伝子から構成されており, そのうち core-genome 遺伝子数は 1,694 個であった。Pan-genome のサイズはゲノムの添加に伴い継続的に増加していったことから, オープンパンゲノムの特性を示し, 水平伝播による遺伝子獲得事象が高頻度に存在する可能性が示唆される。PRGBS 及び PSGBS 全 56 株のゲノムを対象とした SNP に基づく系統樹及び SNP density による組換え予測の解析で, Ia-ST1 の 4 株と III-ST1 の 2 株から成る ST-1 の PRGBS6 株は推定組換え率 5.51 で独立したクレードを形成したが, この値は同じく ST1 に属する血清型 V の PSGBS 株のクレードが示す推定組換え率より 50 倍高かった。病原因子遺伝子, 薬剤耐性遺伝子の VFDB, ResFinder 及び CARD による検索並びに BLASTn による詳細な解析の結果, 本報の血液由来 PRGBS 8 株では *bibA*, *cfb*, *hylB*, *scpB*, *lmb* をはじめ GBS の主要な病原因子遺伝子, *mef(A)* や *msr(D)*, *tet(M)* などの薬剤耐性遺伝子の完全長での保有が確認された。さらに III-ST464 では, GBS では稀な GM 高度耐性を付与する *aac(6')-aph(2'')* が IS256 に挟まれた構造が確認された。なお, 米国由来 PRGBS2 株を含む III-CC19 の 4 株及び V-ST609 の 1 株でそれぞれ IS1548 及びファージ由来配列の挿入によって *hylB* 遺伝子の破壊が認められた。

成人及び新生児由来侵襲性の ST-1 株のほとんどが血清型 V であるのに対し, 本報の血液由来 PRGBS の ST-1 株は血清型 Ia と III であり, 推定される組換え率もより高かった。血液由来 PRGBS 株が多剤耐性であること, また既報の侵襲性 PSGBS 株が保有する病原因子の多くを保有することを明らかにした。

IncF プラスミド POT 法開発のための検出 ORF 候補検索の検討

鈴木匡弘、土井洋平

藤田医科大学医学部微生物学講座

【目的】プラスミドは薬剤耐性遺伝子の伝達にしばしば関与し、プラスミドを介して菌株間あるいは菌種間に薬剤耐性遺伝子が広がる院内感染事例の存在が指摘される。そのため、特にカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌のアウトブレイクの際はプラスミドの伝播も調査した方が良いとされるが、簡易な手法が無いと見逃されることが多いと推測される。プラスミドは不和合性 (Inc 型) により分類され、IncF プラスミドはもっとも保有頻度の高いプラスミドのグループで、薬剤耐性と関連することも多い。しかし、複数個を保有する菌がしばしば観察され、ORF の PCR 検出パターンによる分子疫学解析法では混合したパターンとなるため、遺伝子型の判断が困難という問題がある。そこで、IncF の簡易タイピング法実現のため、まずプラスミド識別能が高い検出 ORF の組み合わせを調査することを目的とした。最終的には検出された ORF パターンから、同一プラスミドを保有する確率を推定することを目指す。

【方法】NCBI データベースからダウンロードした complete ゲノムデータから、PlasmidFinder を用いて IncF プラスミドを選別した。NDM、OXA、KPC、IMP が組み込まれている 283 個のプラスミドデータを選別し、そのうち 150 株から得られた 164 個のプラスミドを検出 ORF 検索の対象とした。残りの 119 個のプラスミドは検証用とした。検出 ORF 候補は検索対象プラスミドの識別能がなるべく高くなるよう、コンピューター上で試行を繰り返し、選択した。

【結果】試行を繰り返して得られた組み合わせから、頻繁に出現する ORF を組み合わせることで、識別能の高い ORF セットが得られた。この ORF セットは検証用プラスミドにおいても検索対象のプラスミドと同等の識別能であった。今後、PCR による検出の可否、及び検出された ORF の検出確率から、2 株間で共有した ORF から、同一プラスミドを保有する確率の推定を目指す。

ORF 系統樹を利用したアウトブレイク解析

林謙吾¹、鈴木匡弘¹、土井洋平^{1,2}

1 藤田医科大学医学部微生物学講座

2 藤田医科大学医学部感染症科

【背景】

現在、医療施設における薬剤耐性菌の蔓延は世界的な問題となっている。なかでも院内感染やアウトブレイクは重大な問題であり、迅速な感染制御や伝播経路の推定が求められている。近年では Whole-genome sequence (WGS)の登場により、菌種の同定や薬剤耐性遺伝子の同定だけでなく、single nucleotide polymorphisms (SNPs)解析や菌株間の疫学的関連性まで解析が可能になった。とくに SNP 解析はアウトブレイクの検出や追跡などに有効な分子疫学解析法とされており、代表的な手法として short-read sequence を用いた core SNP による系統樹解析がある。一方、MinION に代表される Nanopore sequence はリードエラーの多さから SNP 解析には向かないとされるが、その迅速さと導入コストの安さから分子疫学解析への応用が期待される。そこで我々は MinION でも実施可能な分子疫学解析手法の考案を目的として、ORF 保有パターンに着目した系統解析を検討した。

【方法】

藤田医科大学病院から分離されたアウトブレイク株を含む *Enterobacter hormaechei* 64 株、および NCBI からダウンロードした 162 株のドラフトゲノムデータを用いた。MinION によるシーケンスデータから保有する ORF を解析し ORF 系統樹を作成した。このとき、パンゲノム配列とクロモソーム配列の 2 つのパターンについて解析を行った。本研究で用いるクロモソーム配列とは、我々のスクリプトによって推定されたゲノム配列である。これらの ORF 系統樹と Illumina リードによる core SNPs 系統樹(以下 SNP 系統樹)の間で Fowlkes-Mallows index を用いて系統樹の類似性の評価をした。加えて、各菌株間の ORF 保有パターンの差を ORF 距離として算出し、ヒートマップを用いてクラスター解析することで、近縁なクローンでは ORF 距離が近くなることを確認した。

【結果と考察】

ORF 保有パターンにより形成される系統樹のトポロジーは SNP 系統樹のものと完全に同じものにはならなかったが、クラスター単位では類似していた。この特徴は推定クロモソーム配列を用いた ORF 系統樹で顕著にみられた。また、近縁なクローンでは ORF 保有パターンの相関もよく、菌株間の ORF 距離が近くなることが明らかとなった。これはパンゲノムを用いたヒートマップ解析でより明瞭であった。これらの結果から、ORF 系統樹は分子疫学解析に利用できる可能性があり、MinION を用いることで解析時間の短縮につながることを示唆された。

腸内細菌科細菌の tunicamycin resistance protein は aminoglycoside 3-N-acetyltransferase と強く関連する

○津田 裕介¹、和知野 純一^{1,2}、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

Tunicamycin resistance protein(*tmr*)は、ペプチドグリカンやタイコ酸合成経路を阻害する tunicamycin(TM)に対する薬剤耐性遺伝子であり、*Bacillus subtilis* で最初に報告された。*B. subtilis* が持つ Tmr は細胞膜上のポンプとして TM を排出し耐性をもたらすと推定されている。近年、腸内細菌科細菌で *tmr* と名付けられた遺伝子 (*tmrE*) が、aminoglycoside 3-N-acetyltransferase(AAC(3)-II)と隣接する遺伝子構造 (*aacC2-tmrE* region)で世界中から検出されている。しかしながら、これまで *tmrE* の機能に関する研究はなく、また TM は臨床や畜産、農業で使用されていない薬剤で腸内細菌科細菌の増殖を阻害しないことから、*tmrE* が広く分布することは不可解な現象であると考えられた。そこで、TmrE が TM 以外の抗生物質に対する耐性をもたらすと仮定し、TmrE の機能解析を目的に研究を行なった。

ESBLを産生する臨床分離された *Escherichia coli* で 20/100 株で *tmrE* が検出された。この 100 株に対する TM の MIC は >128 µg/mL であった。TM の MIC が <0.06 µg/mL である *B. subtilis* Δ *tmr::ermC* 株で *tmrE* を発現させたところ、その株に対する TM の MIC は <0.06 µg/mL のままであった。これらから、TmrE は *B. subtilis* において TM の耐性に寄与しない可能性が考えられた。次に、*tmrE* 陽性の臨床分離 *E. coli* と *tmrE* 陰性 *E. coli* に対して ampicillin, cefotaxime, cefmetazole, meropenem, ciprofloxacin, ST, fosfomicin で薬剤感受性試験を行なったところ、それらの MIC に株間で差はみられなかった。一方、aminoglycoside 系抗菌薬で薬剤感受性試験を行なったところ、*tmrE* 陽性 *E. coli* に対する gentamicin, sisomicin, kanamycin, tobramycin, dibekacin の MIC が有意に高かった。しかしながら、TmrE を発現させた *E. coli* DH5 α ではそれら aminoglycoside 系抗菌薬への耐性は示さず、この薬剤感受性パターンは AAC(3)-II に起因すると考えられた。これらのことから、TmrE は単独では薬剤耐性に寄与しない可能性を考えた。

そこで、当研究室で開発した薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドのマッピングプログラムを用いて、公共データベースに登録されている *E. coli* 由来のプラスミドについて *tmrE* 周辺の薬剤耐性遺伝子を網羅的に解析したところ、*tmrE* は 256/274(93.4%)で *aacC2*(AAC(3)-IIa/e/d)と隣接した構造を持つことがわかった。ここから TmrE が AAC(3)-II と関連があると考え、C 末端に FLAG tag をつけた TmrE、6xHis tag をつけた AAC(3)-II d をそれぞれ 2 種のベクターを用い DH5 α で共発現させ、共免疫沈降実験を行った。その結果、TmrE-FLAG を免疫沈降した際に AAC(3)-II d-6xHis が共免疫沈降した。この結果から、TmrE が AAC(3)-II d と複合体を作り、これらが強い関連を持つことがあきらかとなった。今後、この複合体に着目し TmrE の機能解析を進めていく。

抗酸菌はなぜ抗菌薬が効きにくいのか？ 抗酸菌内因性薬剤耐性機構の網羅的解析

港雄介

藤田医科大学医学部 微生物学講座

世界三大感染症の一つである結核により、現在でも世界で年間約 140 万人が命を奪われている。結核は主に発展途上国で猛威を振るっている感染症であるが、わが国を含む先進国でも結核菌の類縁菌である非結核性抗酸菌による感染症が増加傾向にあり問題となっている。結核や非結核性抗酸菌感染症の治療は容易ではない。その主な要因として、抗酸菌は多くの抗菌薬に対して抵抗性を示すため、治療期間が長期間を要する点が挙げられる。加えて、薬剤耐性抗酸菌の世界的な拡大によってさらに長期間の治療が必要な症例や、治療不可能な症例が増加している。そこで、より効果の高い新規治療薬の開発が望まれているが、製薬企業による抗菌薬の研究開発は全般的に減少の一途をたどっており、治療の難治化への対応が困難となってきている。

我々は、抗酸菌が抗菌薬に対して抵抗性を示すメカニズムの解明を目的に研究をおこなってきた。そして、抗酸菌の脂肪酸代謝経路やビタミンの生合成経路など、これまで予想されていなかったメカニズムによって、抗酸菌が抗菌薬に対して抵抗性を示していることを明らかにした。本発表では、我々の最新の知見を紹介させて頂き、皆様との今後の共同研究の可能性についても議論させて頂きたい。

マクロ孔型の多孔質炭素を利用した腸管出血性大腸菌の志賀毒素と 3型分泌蛋白質の吸着による病原性抑制

平川秀忠¹、鈴江一友³、滝田綾子¹、富田治芳^{1,2}

¹群馬大学大学院医学系研究科細菌学講座

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講座

[目的] 腸管出血性大腸菌は、食中毒の起因菌であり出血性の下痢に加えて、溶血性尿毒症症候群（HUS）や急性脳症などの発症により重症化することが知られている。本菌の主要な病原性因子として、志賀毒素と3型分泌蛋白質と呼ばれる2種類の病原性蛋白質が知られている。本研究では、上記の病原性蛋白質を吸着すると期待される150nmの細孔を持つ吸着炭を用いて本菌の病原性の抑制を試みた。

[方法] ラテックス凝集反応試験により、志賀毒素の定量を行った。3型分泌蛋白質の定量は抗EspB抗血清を用いたウェスタンブロッティングにより行った。*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] 腸管出血性大腸菌を本吸着炭存在下で培養を行った結果、志賀毒素とEspBの両蛋白質とも強く吸着されることがわかった。一方で、志賀毒素とEspBの発現レベルには影響を与えなかった。本吸着炭を餌とともに摂食させたマウスは、*C. rodentium*感染後は、最終的には全頭死亡するものの、生存日数は有意に延長された。非感染マウスにおいては、本吸着炭摂食により消化管の傷害や生育不良などの異常は認められなかった。さらに、本吸着炭は、乳酸菌や腸球菌などの腸内細菌に対しても悪影響を与えなかった。

[考察] 以上の結果から、本吸着炭は、志賀毒素と3型分泌蛋白質を吸着することで、腸管出血性大腸菌の病原性を減弱できうることが示された。

愛玩動物臨床材料由来 *Pseudomonas aeruginosa* における III 型分泌系毒素遺伝子 *exoU* 保有 international high-risk clone ST235 の出現と広がり

瀧澤志野¹, 坂口かなえ¹, 林航², 泉克俊¹, 吉田諭史¹, 曾我英司¹, 小出将太³,
伊従慶太³, 蕨島健一³, 高野慎也⁴, 北川真喜⁴, 長野由紀子⁵, 長野則之^{1,2,5}

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信州大学学術研究院 保健学系

【目的】

近年, *Pseudomonas aeruginosa* における ST235 をはじめとする多剤耐性 high-risk clones の世界的な広がりが公衆衛生上の深刻な脅威となっている。ヒトと生活環境を共有する愛玩動物はヒト临床上重要な薬剤耐性菌や耐性遺伝子のリザーバー、拡散源になり得る。本研究ではこれまで知られていなかった愛玩動物由来 *P. aeruginosa* の疫学的特性を把握する目的で、薬剤感受性と ST, 保有 III 型分泌系 (T3SS) 毒素遺伝子の関連性を解析する。また、カルバペネム系薬耐性株の遺伝学的特性と耐性機序の解明を試みる。

【材料と方法】2017年8月-2019年10月の間に全国の一次診療動物病院152施設より収集した臨床材料由来 *P. aeruginosa* 240株 (イヌ由来206株, ネコ由来34株) を対象に T3SS 毒素遺伝子 (*exoU*, *exoS*) の検出及び *exoU* 遺伝子保有株の MLST 解析を行なった。また、カルバペネム系薬耐性17株を対象に MLST 解析, PAβN による薬剤排出ポンプ阻害試験及びボロン酸による AmpC 阻害試験を行った。さらに IPM 高度耐性3株を対象に NovaSeq 6000 にて全ゲノム解析を実施した。

【結果と考察】

P. aeruginosa 240株の T3SS virulotype の分布は *exoU*-*exoS*+ が195株 (81.3%) で最も優位で、次いで *exoU*+/*exoS*- が35株 (14.6%), *exoU*-/*exoS*- が7株 (2.9%), *exoU*+/*exoS*+ が3株 (1.3%) であった。*exoU* 保有38株は20の STs に分類され多様であったが、international high-risk clone ST235 及び CC235 が11株 (28.9%) と高頻度に検出されたことが注目される。また、240株中17株がカルバペネム系薬に耐性 (IPM 耐性12株, MEPM 耐性1株, IPM・MEPM 耐性4株) を示し、T3SS virulotype は2株が *exoU*+/*exoS*-, 15株が *exoU*-/*exoS*+ であった。カルバペネム系薬耐性17株は ST235 を含む16 STs に分類され、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。しかしながら、PAβN 添加により17株中8株 (IPM 耐性5株, MEPM 耐性1株, IPM・MEPM 耐性2株) で IPM and/or MEPM の MIC が4倍以上低下したことから、多剤排出ポンプのカルバペネム系薬耐性への関与が示唆された。さらに、IPM 耐性16株中15株でボロン酸添加により IPM の MIC が8倍以上低下し、AmpC 過剰産生のカルバペネム系薬耐性への関与も示唆された。一方、MEPM 耐性5株はボロン酸添加による MIC 低下が認められなかったが、3株で PAβN 添加により MEPM の MIC が4倍以上低下していた。全ゲノム解析により IPM 高度耐性3株は外膜ポーリン遺伝子 *oprD*, 薬剤排出ポンプや AmpC β-lactamase の調節遺伝子に様々な組み合わせの変異を有していた。これにより ST1600/O3 株では AmpC β-lactamase の脱抑制と MexCD-OprJ の過剰発現, ST348/O2 株及び ST235/O11 株では OprD 不活化と MexEF-OprN の過剰発現の相互作用がカルバペネム系薬耐性に関与することが示唆された。また、シプロフロキサシンに高度耐性であった ST1600/O3 株は GyrB のキノロン耐性決定領域 (QRDR) に Ser466Phe のアミノ酸置換を有していた。

本研究では愛玩動物臨床材料由来 *P. aeruginosa* で初めて *exoU* 保有 high-risk clone ST235 (CC235) が高頻度で確認された。これらの株はカルバペネマーゼ非産生であったが、本クローンが薬剤耐性因子を獲得し、拡散する能力を有することから公衆衛生上重要な問題を提起している。本研究の詳細は *Microbiology Spectrum*, volume 9 (issue 2), 2021 に掲載されている。

国産食肉からの薬剤耐性菌の分離状況とゲノム解析について

○山口貴弘¹、河原隆二¹、原田哲也¹、若林友騎¹、中村昇太²、元岡大祐²、松本悠希²、中山達哉³、山本容正⁴、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大阪大学 微生物病研究所 ³広島大学大学院総合生命科学研究科 ⁴岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

【背景】

「薬剤耐性菌」の出現と蔓延は、ヒトの感染症の難治化や畜水産業の経済被害等を引き起こす世界規模の問題であり、One Health approach の観点から、ヒト、環境、畜産の多角的な種々の取り組みが求められている。特に食肉においては、家畜への抗菌薬の使用により、発生・選択された薬剤耐性菌が食品を介してヒトへ伝播する可能性が指摘されている。

本発表では国内に流通する食肉（牛肉、豚肉、鶏肉等）から種々の薬剤耐性菌の分離状況および分離した薬剤耐性菌について薬剤耐性遺伝子等の網羅的解析を実施した結果の一部を報告する。

【方法】

2020年4月から2021年9月までに大阪府、岐阜県、神奈川県で購入した食肉452検体（牛肉135、豚肉144、鶏肉173）を用いた。食肉25gをBPW225gに取り、37℃で一晩培養する。その後、培養液を1μg/mLセフトキシム含有CHROMagar ECC (CTX-ECC)、0.25μg/mLメロペナム含有CHROMoagar ECC (M-ECC)、CHROMagar COL-APSE (COL-APSE)にそれぞれ塗布し、35℃で一晩培養し薬剤耐性菌を分離した。CTX-ECCでは*E. coli*は青色、腸内細菌科細菌は赤色コロニー、M-ECCは*E. coli*は青色、それ以外は赤色、白色コロニー、COL-APSEは藤色コロニーを釣菌し、これまでに計478株を分離した。分離した菌株のうち367株についてはHiSeq (Illumina社)を用いてゲノムデータを取得し解析を行った。菌種の同定は、生化学的性状、MALDI-TOF/MS、全ゲノムMLSTまたはKraken2の結果から総合的に判断した。薬剤感受性試験はドライプレート（栄研化学）を用い、CLSIの方法に従い実施した。また抗菌薬ディスクと阻害剤による、MBL、KPC、ESBL、AmpC等の主要なβ-ラクタマーゼの鑑別試験を合わせて実施した。

【結果・考察】

ゲノムデータを取得した株CTX-ECC分離株249株、M-ECC分離株96株、COL-APSE分離株22株の計367株であった。CTX-ECCで分離した菌種のうち*E. coli*が55.8%を占め、鶏肉由来が136株、豚肉由来が3株であった。またM-ECCでは*Pseudomonas* sp.が85.4%であり、由来は鶏肉が58%と多く、牛肉と豚肉由来はそれぞれ15%と19%であった。

CTX-ECCで分離した*E. coli*はCTX-M遺伝子のうち、*bla*_{CTX-M-2}がもっとも最も検出が多く、ついで-14、-55の順であった。またM-ECCで分離した*Pseudomonas* sp.のうち*bla*_{POM-1}を有する株が10株、*bla*_{POM-2}を有する株が4株であった。POM遺伝子保有の*Pseudomonas* sp.は1株が豚肉由来で残りすべてが鶏肉由来であった。

発表では、さらに詳細な結果を報告予定である。

ネパールの医療施設で分離された高度コリスチン耐性 *Aeromonas jandaei* のゲノム特性

○米田智樹¹、多田達哉^{1,2}、Jeevan B. Sherchand³、切替照雄^{1,2}

¹順天堂大学医学部微生物学講座

²順天堂大学大学院医学研究科微生物学

³トリブバン大学医学部微生物学教室

【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、コリスチン耐性菌が途上国の医療現場で脅威となっている。我々は2019年にネパールの医療機関から分離されたコリスチン耐性 *Aeromonas jandaei* 1株を分離した。*A. jandaei* は1991年に魚類に病原性を示す新菌種として同定され、以降、ヒトからの分離報告はほとんどない。本研究では、コリスチン耐性 *A. jandaei* におけるコリスチン耐性因子を明らかにするとともに、そのゲノム特性を解析した。

【方法】2019年にネパールの医療機関から分離されたコリスチン耐性 *A. jandaei* 1株を用いた。 β -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完全長ゲノムの決定、コリスチン耐性因子の同定を行った。さらに、新規に同定されたコリスチン耐性因子を大腸菌及び *Aeromonas hydrophila* にクローニングし、大腸菌及び *Aeromonas* 属菌におけるコリスチン感受性を比較するとともに、両菌種におけるコリスチン耐性因子の発現を qRT-PCR により比較した。

【結果と考察】*A. jandaei* JUNP479 株はセフトリアキソン耐性 (8 $\mu\text{g/ml}$)、イミペネムに中等度耐性 (2 $\mu\text{g/ml}$) 及びコリスチン高度耐性 (128 $\mu\text{g/ml}$) であったが、それ以外の β -ラクタム系薬、アミノグリコシド系薬及びキノロン系薬に対しては感受性であった。得られた完全長ゲノムから薬剤耐性因子を決定したところ、内因性のイミペネム耐性因子 *chf*、class C β -ラクタマーゼ *bla_{FOX}* 及び4種類の phosphoethanolamine transferase を保有し、すべて染色体上に存在していた。4種類の phosphoethanolamine transferase をコードする遺伝子の内、3種類は *mcr-3* に類似したの遺伝子 (*eptAv3.2*, *eptAv3.3* 及び *eptAv3.4*) 及び *mcr-7* に類似した遺伝子 (*eptAv7.2*) であり、*eptAv3.3* と *eptAv3.4* はタンデム構造になっていた。それぞれの遺伝子を大腸菌及び *A. hydrophila* にクローニングした結果、3種類の *eptAv3* は大腸菌でコリスチン感受性が低下し、*eptAv7.2* は *A. hydrophila* でコリスチン感受性が低下した。大腸菌に発現させた *eptAv3.2*、*eptAv3.3*、*eptAv3.4* 及び *eptAv7.2* の mRNA 発現量を比較すると *eptAv7.2* の発現が有意に低下し、*A. hydrophila* に発現させた上記4遺伝子の発現量は *eptAv7.2* の発現が有意に上昇していた。EptAv3, EptAv7, MCR-3 及び MCR-7 の系統解析から、EptAv3 を含む MCR-3 類似遺伝子は *Aeromonas* 属及び腸内細菌科細菌から広く検出されているが、EptAv7 を含む MCR-7 遺伝子のほとんどは *Aeromonas* 属から検出されていることが明らかとなった。本研究から *Aeromonas* 属菌は *mcr-3* 及び *mcr-7* 遺伝子のリザーバーであることが示唆された。

CTX-M 型 ESBL 産生腸内細菌目細菌を迅速に検出するウサギモノクローナル抗体を用いたラテラルフロー免疫アッセイ法

西田 智¹、中川 真隆²、芥 照夫²、丸山 俊昭³、吉野友祐¹、斧 康雄^{1,4}

¹ 帝京大学医学部微生物学講座

² 極東製薬工業株式会社研究開発部門研究部

³ Abwiz Bio Inc.

⁴ 帝京平成大学健康メディカル学部

CTX-M 型の基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生する腸内細菌目細菌による感染症は、臨床現場において深刻な脅威となっている。プラスミド上の CTX-M 遺伝子が多くの腸内細菌目細菌に導入され、これらの株が拡散しているため、世界的な抗菌薬耐性の問題に発展している。今回、我々は抗 CTX-M ウサギモノクローナル抗体を用いたラテラルフロー免疫アッセイ法 (LFIA) を開発した。この抗体は臨床分離株に発現している CTX-M-9、CTX-M-2、CTX-M-1 グループの CTX-M 亜種を検出した。LFIA は寒天培地上の臨床分離株に対して 100% の感度と特異性を示し、検出限界は 0.8 ng/mL のリコンビナント CTX-M-14 であった。また、ウサギのモノクローナル抗体は SHV を含む他のクラス A β -ラクタマーゼを産生する細菌とは交差反応しなかった。以上のように、我々は腸内細菌目細菌の CTX-M 酵素産生を検出できる高感度かつ特異的な LFIA を開発した。今回開発した LFIA は、病院や地域医療における CTX-M の迅速な検出を可能にするポイントオブケア検査法 (POCT) として、また、迅速な環境検査法としての活用が期待される。

参考文献：Nishida S, et al.. Int J Biol Macromol. 2021; 185:317-323.

市中下水におけるカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌の経時的疫学調査、 *bla*_{GES} 遺伝子及び保有菌種の多様性

林航¹、瀧澤志野²、坂口かなえ²、泉克俊²、吉田諭史²、于連升³、鹿山鎮男³、
菅原庸³、菅井基行³、長野由紀子⁴、長野則之^{1,2,4}

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国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター、⁴信州大学学術研究院 保健学系

【目的】国内の水系環境におけるカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌 (CPGNR)の実態は明らかでない。本報では市中下水に着目し、CPGNR の経時的疫学調査を実施した結果を報告する。

【材料と方法】2020年12月から隔月5回にわたり長野県松本市の下水処理施設で採水した流入下水 (A, B, C 流入口)、放流水、放流口の上流・下流河川水全30試料を対象に、CPGNR の定量的検出を行った。さらに12月採取の流入下水 (B, C 流入口)から検出された *bla*_{GES-5} 保有 *A. caviae*, *A. veronii*, *R. ornithinolytica*, *bla*_{GES-4} 保有 *K. oxytoca* の計4株を対象に全ゲノム解析 (MiSeq・MinION)を実施した。

【結果と考察】市中下水30試料よりCPGNRが64株検出され、菌数は $5.0 \times 10^1 \sim 4.5 \times 10^2$ CFU/mL であった。MALDI-TOF MSによる菌種同定の結果、64株の内訳は *A. caviae* 22株、*K. pneumoniae* 8株、*R. ornithinolytica* 7株、*E. cloacae* 及び *K. oxytoca* 各6株、*A. hydrophila* 及び *A. veronii* 及び *C. freundii* 各4株、*R. planticola* 2株、*K. cryocrescens* 1株であった。保有カルバペネマーゼ遺伝子は *bla*_{GES-5} が24株と最も多く、*bla*_{GES-4} が13株、*bla*_{GES-48} が10株、*bla*_{GES-24} が8株、*bla*_{GES-6}, *bla*_{IMP-1} 及び *bla*_{IMP-1}・*bla*_{GES-24} が各2株、*bla*_{GES-47}, *bla*_{GES-49} 及び *bla*_{IMP-10} が各1株であった。また、*Klebsiella* spp. 及び *Aeromonas* spp. が保有する新規 *bla*_{GES-47}, *bla*_{GES-48}, *bla*_{GES-49} がプラスミド上に確認された。CPGNR 64株のうち59株が保有する *bla*_{GES} や *bla*_{IMP} はクラス1インテグロンに担われていたが、*A. caviae* が保有する *bla*_{GES-5} (4株)及び *bla*_{GES-6} (1株)はクラス3インテグロン内に認められた。なお、放流水及び河川水からCPGNRは検出されなかった。

全ゲノム解析から *A. caviae* が保有する *bla*_{GES-5} は下流の *aacA4* と共に水系環境由来 *Aeromonas* との関連性が示唆される IncU プラスミド (約55 kb)上に存在し、さらにプラスミド性キノロン耐性遺伝子 *qnrS2* を担う mobile insertion cassette も確認された。また、Tn5393上にコードされるストレプトマイシン耐性遺伝子 *strA-strB* の染色体への挿入が認められた。*A. veronii* が保有する *bla*_{GES-5} は Inc 不定のプラスミド (約26 kb)に担われ、*bla*_{GES-5} の下流に新規な OXA-1 family オキサシリナーゼ遺伝子 *bla*_{OXA-1-1bc} が確認された。さらに、本菌は総塩基長約22 kbのプラスミドも同時に保有していたが、本プラスミドには多剤耐性遺伝子カセット *qnrVC4-qauI14-aacA4-cmlA5-bla*_{OXA-10}-*aadA1-dfrA14* を有するクラス1インテグロンが存在していた。また、*bla*_{GES-5} 保有 *R. ornithinolytica* は ANI 解析により *R. planticola* と決定され、*bla*_{GES-5} を担う IncFII/IncR プラスミド (約132 kb)上に *bla*_{OXA-4}, *aacA4*, *aadA8*, *sul1*, *catB10*, *tet(E)* が存在していた。一方、*bla*_{GES-4} 保有 *K. oxytoca* は ANI 解析で *K. michiganensis* と決定され、ST95に属していた。*bla*_{GES-4} が担われる Inc 不定のプラスミド (約38 kb)は、国内の病院下水由来 *E. kobei* が保有する *bla*_{GES-24} プラスミドと高い配列類似性 (93% cover/99% identity)を示したことが注目される。

本研究で *bla*_{GES} 保有 CPGNR が *Aeromonas* spp. を中心とした複数菌種で継続的に検出され、市中下水での本菌の定着性が示唆される。さらに下水環境が耐性遺伝子を担うプラスミドやインテグロンなどの可動性遺伝因子のリザーバーとなり、*bla*_{GES} の多様化・拡散に関わる可能性が考えられる。

医療施設下水における ESBL 産生 *Escherichia coli* およびカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌の経時的変遷

坂口かなえ¹, 加地大樹², 瀧澤志野¹, 林航³, 泉克俊¹, 吉田諭史¹, 于連升⁴, 鹿山鎮男⁴,
菅原庸⁴, 菅井基行⁴, 長野由紀子⁵, 長野則之^{1,3,5}

¹信州大学大学院 医学系研究科, ²国保君津中央病院 臨床検査科,
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信州大学学術研究院 保健学系

【目的】病院下水は薬剤耐性菌のリザーバーとなり、耐性菌や耐性遺伝子の市中環境への拡散、病院環境への逆行性汚染を招く危険性が考えられる。本報は国内で実施されていない病院下水の経時的調査で検出した ESBL 産生 *Escherichia coli* (ESBL-Ec) 及びカルバペネマーゼ産生グラム陰性桿菌 (CPG NR) の保有薬剤耐性遺伝子及び病原遺伝子の解析を目的とする。

【材料と方法】2021 年 1 月から隔月 5 回にわたり千葉県内医療施設の下水を採取した。 *E. coli* (Ec) 及び ESBL-Ec の定量的検出にはそれぞれ TBX 寒天培地及び CTX 4mg/L 含有 TBX 寒天培地を用いた。また、1 月及び 3 月の試料由来 ESBL-Ec 26 株の WGS 解析を行った。 CPG NR の定量的検出には mSuper CARBA (関東化学) および IPM 1 mg/L 含有マッコンキー培地の発育コロニーを対象に、PCR スクリーニング及びシーケンス解析によるカルバペネマーゼ遺伝子の同定を行った。

【結果と考察】 Ec の検出菌数は 1, 3, 5, 7 及び 9 月で各々 8.1×10^3 , 8.8×10^4 , 8.6×10^4 , 5.9×10^4 及び 4.3×10^4 CFU/mL であった。 Ec に占める ESBL-Ec の割合は 25%, 1%, 19%, 95%, 0% と採取月により著しい変動が認められた。しかしながら、同施設の臨床材料由来株で算出された ESBL-Ec/Ec との相関は認められなかった。注目すべきことに 9 月採取の下水試料では Ec の検出菌数に変動は認められなかったものの ESBL-Ec は検出されなかった。 CTX 含有 TBX 寒天培地に発育した微小コロニーの精査の結果、 Ec では稀な *bla*_{DHA-1} 保有株が 9.5×10^3 CFU/mL 検出され、 *bla*_{DHA-Ec/Ec} は 22% であった。本調査では下水中の ESBL-Ec/Ec の変動や ESBL-Ec から AmpC 産生株への置き換わりの要因については不明であった。 1 月及び 3 月採取の試料由来 ESBL-Ec 26 株の WGS 解析で *bla*_{CTX-M-14} 保有 B2-O25b:H4-ST131-H30 が 24 株、 *bla*_{CTX-M-27} 保有 D-O17:H18-ST69-H27 が 1 株、 *bla*_{CTX-M-14} 保有 D-O2:H30-ST38-H5 が 1 株同定された。臨床的に重要な B2-O25b:H4-ST131-H30 の 24 株は wgMLST 解析で 2 つのクラスターに分類されたが、4 株で形成されるクラスターは 20 株で形成されるクラスターに比較し、アミノグリコシド耐性遺伝子や ST 合剤耐性遺伝子など多くの薬剤耐性遺伝子を保有する特徴が見られた。

CPG NR は 5 試料から 24 株 ($5.0 \times 10^1 \sim 4.2 \times 10^2$ CFU/mL) 検出され、内訳は *A. caviae* 10 株、 *A. hydrophila* 8 株、 *E. asburiae* 3 株、 *K. oxytoca* 2 株、 *P. putida* 1 株であった。これら 24 株が保有するカルバペネマーゼ遺伝子は *bla*_{IMP-1} が 13 株と最も多く、次いで *bla*_{GES-24} が 9 株、 *bla*_{GES-4} が 2 株であった。 *bla*_{GES-24} 保有 9 株中 4 株が *bla*_{MOX} も同時に保有していた。カルバペネマーゼ遺伝子は全てクラス 1 インテグロンに担われていた。 *bla*_{IMP-1} 保有 *A. caviae* 及び *A. hydrophila* は継続的に検出されており、医療施設の下水環境中に定着している可能性が示唆される。

本知見からこれまで報告のない病院下水中の薬剤耐性菌のダイナミックな経時的変遷が明らかとなった。これらの薬剤耐性菌の実態は必ずしも臨床材料由来株における実態を反映しているとは限らず、種々抗菌薬残存下・富栄養下にある病院下水環境での耐性菌 (耐性遺伝子) の定着・拡散、さらには病院排水設備への耐性菌 (耐性遺伝子) の定着・拡散を監視していく必要がある。

同一患者由来、長期保菌後の尿路病原性大腸菌 ST405 から検出された一塩基多型

○綿引正則¹、内田薫^{1*}、中村雅彦¹、金谷潤一¹、磯部順子¹、木全恵子¹、大石和徳¹、
高本恭子²、佐々木一成²、高橋慎太郎²、得田和彦²

¹富山県衛生研究所細菌部 (*現富山県高岡厚生センター)、²富山労災病院

【背景】2019年4月(症例A)と8月(症例B)に入院期間や病棟など接点がない入院患者から、それぞれNDM-5メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生大腸菌が、いずれも保菌状態で、尿および喀痰から分離された¹⁾。当初、医療関連感染を疑い、病原体の細菌学的な関連性を調査したところ、MLST等分子疫学的は型別では一致せず、その関連性は否定された。さらに、一年後、症例Aの患者の通院時の検査で、一年前に分離された同じST405の大腸菌が便および尿から再び分離された。尿から分離された大腸菌は、NDM-5MBL遺伝子は保有していなかった。この一年後の株のプラスミドの脱落に伴いNDM-5遺伝子を失ったと考えられたが、同一患者内の保菌期間における大腸菌のゲノム配列の動態を解析する良い事例であると考えられた。そこで、症例Aから得られた大腸菌の全ゲノムMLSTをベースとする一塩基多型(SNP)解析を実施したので報告する。

【材料と方法】

供試大腸菌は、症例Aの2019年に分離された#1103(尿由来)と#1104(喀痰由来)、及び2020年に分離された#1163(尿由来)と#1164(便由来)の4株を用いた。MiSeqを用いて得られた配列(fastq.gz)は、quality trimming後、Spades(assembly)、RAST(annotation)、nucmer及びsnippy(SNP calling)を用いてSNPを同定した。

【結果】assemblyとannotation後、4株間でindelsのない共通の遺伝子コード領域(CDS)は5,038個検出され、各株において検出された全CDSの約94%を占め、12SNPローカスを検出した。この4株のSNPローカスはPCR後、サンガー法にて配列を確認した。2019年分離の2株間では5SNPs異なり、1年後の尿から分離された#1163株はこれに6SNPs加わっていた。得られた12SNPs関連遺伝子のうち、9SNPsはアミノ酸変化を伴っていた。特に#1163株は、9SNPsの内、6SNPsが検出され、該当する遺伝子は、*lrhA*、*ompC*、*agaA*、*rph*、*ecFixC*、及び*cat*であった。*lrhA*の表現型試験として、*in vitro*バイオフィーム形成試験を実施したところ、#1163株のバイオフィーム形成能は他の3株より増大していた。

【考察】尿路病原性大腸菌ST405は世界的流行株のひとつであり、NDM-5MBLを産生する株として既に報告されており、我国には既に定着していると思われる。このような株がどのように変化をしていくのか、すでにいくつかの報告があり、長期にわたる家族内感染によるSNP解析の結果、*lrhA*や乳糖分解関連遺伝子のSNPは、尿路に適応的なSNPとして報告されている。今回の症例Aの株については、特に1年後の尿から分離された#1163株は、I型繊毛発現やバイオフィーム形成に関与する、転写調節因子の一つである*lrhA*のSNPにより、バイオフィーム形成能が増大しており、膀胱内の定着能力が増大していることが示唆された。また、1年目の#1103株と2年目の#1163株のSNPsの比較から、保菌中の本菌の生体内の移動が示唆された。今回の事例は、同一患者内の長期保菌による病原菌の動態を観察した貴重な結果を提供すると思われる。

【文献】1) 病原微生物検出情報(IASR), 41(5), 86(2020)

Practical Agar-Based Disk Diffusion Tests Using Sulfamoyl Heteroarylcarboxylic Acids for Identification of Subclass B1 Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacterales*

法月 千尋^{1,2}、和知野 純一^{1,5}、金 万春¹、木村 幸司¹、川村 久美子³、
長野 則之⁴、荒川 宜親⁵

- 1 名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻 分子病原細菌学講座
- 2 公立陶生病院 臨床検査部
- 3 名古屋大学大学院医学系研究科 総合保健学専攻 オミックス医療科学
- 4 信州大学大学院 総合医理工学研究科 医学系専攻
- 5 修文大学 医療科学部 臨床検査学科

【目的】

カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (Carbapenemase-producing *Enterobacterales*: CPE) はグラム陰性桿菌による感染症の治療に用いられるカルバペネム系抗菌薬に耐性を示すため、現在世界的に問題になっている薬剤耐性菌である。本研究では、所属研究室が開発したサブクラス B1 metallo- β -lactamase (M β L) に特異的な阻害剤 2,5-dimethyl-4-sulfamoylfuran-3-carboxylic acid (SFC) および 2,5-diethyl-1-methyl-4-sulfamoylpyrrole-3-carboxylic acid (SPC) を用いたサブクラス B1 M β L 産生腸内細菌科細菌のスクリーニング検査法を構築した。

【方法】

M β L 産生菌 65 株、セリン型カルバペネマーゼ産生菌 54 株、およびカルバペネマーゼ非産生カルバペネム耐性菌 9 株の合計 128 株を使用した。SFC と SPC の 2 種類のサブクラス B1 M β L 阻害剤を用い、①Double-disk synergy test (DDST)、②disk potentiation test、③modified carbapenem inactivation method (mCIM) の 3 法について、それぞれ感度・特異度を算出した。

【結果】

DDST と mCIM においては SFC と SPC の感度は 95.3%、特異度 100%、disk potentiation では SFC の感度 89.1%、SPC の感度 93.8%、特異度はいずれも 100%であった。

【結論】

今回新たに構築したサブクラス B1 M β L 産生株の鑑別試験法は、高感度、安価、簡便であるため、微生物検査室における日常検査として導入することが可能である。本検査法の導入により、CPE 感染症に対する感染制御の向上および適正な抗菌薬の選択に貢献することが期待できる。

日本の医療施設で分離されたST1816に属するVIM型メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌のプラスミド解析

○菱沼知美¹、多田達哉¹、遠矢真理¹、大城聡¹、小川美保²、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。2012年から2018年に分離されたVIM型MBL産生菌の分子疫学解析を行った結果、ST1816に属するVIM型MBL産生菌13株が、*bla*_{VIM}遺伝子をプラスミド上に保有していることが分かった。本研究では、*bla*_{VIM}を保有するプラスミドの比較ゲノム解析を実施すると共に、プラスミドの特性解析を実施した。

【方法】2012年から2019年に日本で分離されたST1816に属するVIM型MBL産生カルバペネム耐性緑膿菌13株を用いた。全ゲノム解析により*bla*_{VIM}を保有するプラスミドの完全長プラスミド配列を決定し、比較ゲノム解析を行った。*P. aeruginosa* PAO1を用いて*bla*_{VIM}遺伝子保有のプラスミドの接合伝達試験および形質転換試験を実施した。プラスミド性*bla*_{VIM}遺伝子を保有するST1816緑膿菌からTotal RNAを抽出してreal-time PCRで遺伝子発現を解析し、ウェスタンブロッティングによりタンパク発現量を解析した。

【結果と考察】VIM型MBLを産生するST1816緑膿菌の分離数は、2012年以降2015年までは0株、2016年が3株、2017年が5株、2018年が3株および2019年が2株だった。ST1816緑膿菌13株中12株が愛媛県の医療施設で分離され、1株のみが広島県の医療施設で分離されていた。*bla*_{VIM}遺伝子のタイピングの結果、13株中4株が*bla*_{VIM-24}、5株が*bla*_{VIM-60}、4株が*bla*_{VIM-66}であり、すべて59,422 bp - 65,553 bpのプラスミド上に存在していた。比較解析の結果、13株の*bla*_{VIM}遺伝子を含むインテグロン構造は類似していたが、プラスミド構造は愛媛県由来(12株)と広島県由来株(1株)で異なっていた。愛媛県で分離された12株のプラスミドは2020年に中国で報告された*P. putida* strain MX-2のプラスミドと類似し(query cover: 76-78%, identity: 99%)、広島県で分離された1株のプラスミドは2016年にブラジルで報告された*P. aeruginosa* strain PA7790のプラスミドと類似していた(query cover: 64%, identity: 98%)。13株中4株が保有する*bla*_{VIM-24}遺伝子はプラスミド上にタンデム構造を形成していた。このプラスミドは*P. aeruginosa* PAO1へ接合伝達は生じなかったが、エレクトロポレーションによって導入され、cefepime, ceftazidime, imipenem および meropenem に対して耐性を獲得した。real-time PCR およびウェスタンブロッティングの結果、VIM-24の発現は増加しなかった。以上の結果より、ST1816カルバペネム耐性緑膿菌はプラスミド性の*bla*_{VIM}遺伝子を保有し、特定の地域で広まっていることが明らかとなったが、そのプラスミド伝達性は低いことが示唆された。