

主論文の要旨

**Genetic and epidemiological analysis of
ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in
three Japanese university hospitals**

（日本の3大学病院におけるESBL産生*K. pneumoniae*の
遺伝的および疫学的解析

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
生体管理医学講座 臨床感染統御学分野

(指導：八木 哲也 教授)

岡 圭輔

【緒言】

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生 *Klebsiella pneumoniae* (EPKP) による感染症が世界的に増加しており、EPKP は一般的にセファロスポリン系抗菌薬に耐性である。ESBL の型は、当初は TEM または SHV タイプが主流だったが、2000 年代にはより耐性度の高い CTX-M タイプの ESBL に置き換わった。EPKP の検出率は国や地域ごとの差が指摘されていたが、日本での EPKP の分子疫学を検討した研究は少ない。ESBL 産生 *K. pneumoniae* の薬剤耐性の遺伝的背景と疫学を明らかにするために、地理的に離れた日本の 3 大学病院より菌株を収集し解析を行った。

【方法】

2014 年 1 月から 2016 年 12 月に旭川医科大学病院、九州大学病院、名古屋大学医学部附属病院で検出、保存された EPKP 118 株 (同年での初回検出株) を対象とした。菌株を名古屋大学医学部附属病院に収集し、Vitek MS (ビオメリュー) で菌種同定し、ESBL 産生の確認試験をクラブラン酸によるディスク法、または市販の ESBL 検出キットであるシカベータテスト (関東化学) を使用した。MicroScan WalkAway (ベックマン・コールター) で薬剤感受性試験 (CLSI M100 Ed28 に準拠) を実施した。

3 施設の Sequence Typing (ST) の分布について、Multilocus sequencing typing (MLST) によるクラスター解析を実施した。ST はパスツール研究所のデータベースに照合し、ST が決定できなかった株は次世代シーケンサー (MiSeq : イルミナ) で解析した。

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) - PCR および電気泳動を実施し、得られたバンドから BioNumerics ver. 7.1 (Applied Maths) を用いてデンドログラムを作成し遺伝学的距離を解析した。

ESBL 遺伝子の検出は、シカジーニアス ESBL 遺伝子型検出キット (関東化学) を使用し、ESBL のグループを決定し、PCR シーケンスを実施し、BLAST データベースに照合し、ESBL 遺伝子型 (CTX-M 型、SHV 型、TEM 型) を決定した。

プラスミド媒介フルオロキノロン耐性 (PMQR) 遺伝子 (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*) を PCR で検出した。シプロフロキサシン (CPFEX) が非感性の 65 株に対し、シーケンス解析を行い BLAST に照合しキノロン耐性決定領域 (QRDR) 遺伝子変異 (*gyrA*, *parC*) を解析した。PMQR および QRDR 遺伝子変異の有無による、CPFEX およびレボフロキサシン (LVFX) の最小発育阻止濃度 (MIC) 値の関連をカイ二乗検定で解析した。

【結果】

2987 株の *K. pneumoniae* が検出されたが、EPKP は 144 株 (4.8%) で、旭川医科大学病院、九州大学病院、名古屋大学病院がそれぞれ 1.2% (11/891)、6.4% (50/776)、5.9% (83/1320) だった。MLST 解析では 62 種類の ST が検出され、そのうち 43 種類が単一株からのみ検出された。4 つの未登録の ST が 7 株で同定された。クラスター解析とシン普森の多様度指数 0.967 の結果から、ST の多様性が高いことを示していた (Figure 1)。ST25 (n = 12) が最も多く、ST45 (n = 8)、ST17 (n = 7)、ST15 (n = 6) がそれに続いた。

3つの病院すべてから検出された ST は存在しなかった。

ESBL 遺伝子は、CTX-M-15 が 40 株、CTX-M-14 が 32 株、CTX-M-3 が 10 株、CTX-M-2 が 9 株だった。ESBL タイプの SHV 型は 108 株中 27 株 (25%) で、TEM 型はすべて TEM-1 であり ESBL タイプではなかった。CTX-M-15 産生株は、ST25 の 9 株、ST45 の 6 株、ST15 の 5 株、ST5455 の 4 株であった。CTX-M-3 産生株と CTX-M-14 産生株の半数以上が単一の ST であった (Figure 2)。

LVFX の非感性率は 26/118 (22.0%) で CPFEX の非感性率は 65/118 (55.1%) であった。91 株 (77.1%) に PMQR 遺伝子が存在した。*qnrS* は 46 株、*aac(6')-Ib-cr* は 37 株、*qnrB* は 34 株、*qnrA* は 3 株で検出された。LVFX に対する非感性率は、PMQR 遺伝子保有群で 26.4%、PMQR 遺伝子を保有しない群で 7.4% だった ($p=0.038$)。CPFEX に対する非感性率は、PMQR 遺伝子保有群で 67.0%、PMQR 遺伝子を保有しない群で 14.8% だった ($p<0.001$)。PMQR 遺伝子数が増えると、LVFX と CPFEX に対する非感性率が増加した (Figure 3a, 3b)。CPFEX に非感性の 65 株のうち 63 株 (96.9%) は少なくとも 1 つの PMQR 遺伝子を保有し、14 株 (21.5%) は少なくとも 1 つの QRDR 変異を保有していた。LVFX と CPFEX に対する非感性率は、PMQR 遺伝子の蓄積で増加した。PMQR 遺伝子と QRDR 変異が蓄積すると LVFX と CPFEX の MIC が増加した (Figure 3c, 3d)。

【考察】

EPKP の検出率は 4.8% であり、日本からの以前の報告と同様で他国の報告よりも低かった。ST131 が世界中で拡散している ESBL 産生大腸菌とは異なり、EPKP に優勢な ST はなかった。最も多く認めた ST25 でさえ 12 株のみだったが、3つの病院のうち 2 つだけで検出された。EPKP の ST の分布について将来の傾向に細心の注意を払う必要がある。MLST と ERIC-PCR は同様の識別力を持っているように見えた。最も一般的な CTX-M タイプは CTX-M-15 であり、CTX-M-14 と CTX-M-3 が続いたが、この結果は以前の報告と一致した。LVFX と CPFEX の MIC は、PMQR 遺伝子を保有しないグループよりも PMQR 遺伝子を保有するグループの方が高かった。また PMQR 遺伝子の保有と QRDR 変異をともに持つ群では、PMQR 遺伝子のみ保有群と比較して LVFX と CPFEX の MIC が上昇していた。キノロンに対するわずかな MIC 上昇の蓄積が、mutant selection window の増加につながり、さらなる耐性につながる可能性があるため、今後の流行状況に注視が必要と考えられた。

【結語】

地理的に離れた 3 つの日本の大学病院の EPKP は分子疫学的に多様性を示した。ERIC-PCR と MLST の間にはある程度の相関関係があった。最も一般的な ESBL と ST は、CTX-M-15 と ST25 であった。PMQR 遺伝子と QRDR 変異の蓄積は、EPKP 分離株における LVFX と CPFEX の MIC の上昇に寄与していた。疫学的変化の傾向を監視するには、 β -ラクタムとフルオロキノロンに対する耐性の観点から EPKP 分離株の流行状況を継続的に監視する必要があり、さらなる疫学的解析が必要と考えられた。