

主論文の要旨

**Genetic profiles of fluoroquinolone-non-susceptible
Klebsiella pneumoniae among cephalosporin-resistant
*K. pneumoniae***

〔 第3世代セファロスポリン耐性肺炎桿菌における
フルオロキノロン非感受性株の遺伝学的特性 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
微生物・免疫学講座 分子病原細菌学分野

(指導：荒川 宜親 教授)

山口 由紀子

【はじめに】

フルオロキノロン(FQ)耐性腸内細菌科の臨床分離株が近年世界各地で増加している。特に大腸菌では O25b:H4-ST131 の系統に属する株の世界的な広がりによって耐性株の占める割合が急増している。また肺炎桿菌は院内感染の原因菌の一つであり、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) のみならずカルバペネマーゼを産生する主な菌種である。さらに ESBL を獲得した株は、FQ 系薬剤を含む他の多くの抗菌薬に耐性を獲得し多剤耐性株となりつつある。これらの株は世界的に問題となっているが、2012 年に日本において FQ 耐性大腸菌が 34%であるのに比べて FQ 耐性肺炎桿菌は 2.4%といまだ低い割合にある。そこで我々は先ほどの大腸菌 ST131 のように、FQ 非感性肺炎桿菌は特定の系統に属する株が広がっているのではないのかと仮説をたて日本各地の 23 の病院で採取されたセファロsporin耐性株から FQ 非感性の株を抽出し分子疫学的解析を行った。

【材料と方法】

検体：2009-2012 年の間に日本各地の 11 県の 23 の病院から第 3 世代セファロsporin系薬剤に耐性と判定された 102 株の肺炎桿菌を集め、CLSI の判定基準(M100-S20)に従い寒天平板希釈法によってシプロフロキサシンあるいはレボフロキサシンに非感性もしくは耐性と判定された 61 株を抽出した。その後、遺伝的に同等な株を除外するため Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)を行い最終的に 29 株を選択し解析対象とした。

薬剤感受性検査：CLSI (M07-A8) に従い以下の薬剤について最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。セフトキシム (CTX)、イミペネム(IPM)、アミカシン (AMK)、ゲンタマイシン (GEN)、シプロフロキサシン (CIP)、コリスチン (CST)、ホスホマイシン (FOF)、セフトジジム (CAZ)、レボフロキサシン (LVX)、セフェピム (FEP)、セフミノクス (CMNX)、チゲサイクリン (TGC)。ホスホマイシンの MIC 測定はグルコース-6-リン酸を添加して実施した。

Multilocus sequence typing (MLST)：The Institute Pasteur website のプロトコールに従い MLST 解析を行った。

β-ラクタマーゼ及びプラスミド媒介性キノロン耐性因子(PMQR)の検出：以下の遺伝子を PCR 法にて検出した。*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M-1 group}、*bla*_{CTX-M-2 group}、*bla*_{CTX-M-9 group}、*bla*_{AAC}、*bla*_{FOX}、*bla*_{MOX}、*bla*_{DHA}、*bla*_{CIT}、*bla*_{EBC}、*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*qnrC*、*qnrD*、*qepA*、*aac*-(6')-Ib。さらに *bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M-1 group}、*bla*_{CTX-M-2 group}、*bla*_{CTX-M-9 group}、*aac*-(6')-Ib に関しては塩基配列のシーケンス解析を行った。

キノロン耐性決定領域(QRDR)の変異検出：GyrA および ParC の遺伝子のシーケンス解析を行い変異の検出を行った。

プラスミド媒介性キノロン耐性遺伝子(PMQR)の解析：大腸菌 J53 を受容菌としてアザイド 150 mg/L および CIP 0.05mg/L 入り LB 寒天培地にてプラスミドの接合伝達実験を行った。接合体が得られなかった株に関しては大腸菌 DH10B を受容菌として

CIP 0.05mg/L 入り LB 寒天培地を用いてエレクトロポレーション法によりプラスミドの導入実験を行った。どちらの方法でも接合体もしくは形質転換体を得られなかった株に関してはアンピシリン 100 mg/L 入り LB 寒天培地を用いて再びプラスミドの導入実験を行った。

【結果】

薬剤感受性試験：セファロsporin系薬剤は、試験株に対し第4世代薬が第3世代薬に比べ比較的低い MIC を示した。また多くの株はカルバペネム系薬に感性和判定されたが非感性的であった2株は後の解析で各々 *bla*_{NDM} と *bla*_{IMP} を有していることが判明した。(Table 1)

MLST: MLST の結果をTable 2 に示す。最も多く検出された ST は ST37 (5/29;17%) で、ST17(4/29;14%)が続いた。ST20 と ST17 は clonal complex(CC)17 を形成し ST20 が1株と ST17 での4株の計5株が検出された。ST11 は2株検出された。また今回新たに同定された ST1130 は ST528 と CC528 を形成した。これらの4つの ST もしくは CC で全体の 48.2% を占めた。

ESBL および PMQR 遺伝子の検出：結果をTable 2 に示す。15/29 株にて *bla*_{CTX-M} が検出された。*bla*_{SHV} はほとんどの株で検出できたが ESBL であったものは *bla*_{SHV-12} の3株のみであった。AmpC 型β-ラクタマーゼは *bla*_{DHA} のみ検出された。18/29 株において QnrA や QnrB、AAC(6')-Ib-cr などの PMQR を保有しており一部に複数の PMQR を保有している株も認められた。

QRDR 変異の検出：QRDR に複数のアミノ酸置換を獲得している株は FQ の MIC が高値であった。さらに ST37 および ST11 に属するすべての株において QRDR に2つ以上の変異が確認された。9/29 株でアミノ酸置換が検出できなかったが、これらすべての株では1つ以上の PMQR を保有していた。(Table 2)

キノロン耐性遺伝子の接合伝達実験及び形質導入実験：

PMQR を保有している18株のうち11株において接合もしくはエレクトロポレーション法により形質転換体を得られた。(Table 3)

【考察】

MLST 解析の結果、日本におけるセファロsporin耐性肺炎桿菌の CIP 非感性的株の多くは ST37 と CC17 の2つの ST に分類されることが明らかとなった。さらにこれらに加え ST11 を含めた3つの ST が約半数を占め、これらの ST は世界各地で多剤耐性株との関連性が報告され問題となっているカルバペネマーゼ産生肺炎桿菌が多く含まれる CC37 に属する。さらに他の ST と比べて ST37 と ST11 は複数の QRDR 変異を獲得し、他の ST 型より高い FQ 耐性度を示すことから、度重なる FQ 系薬剤投与によりこれらは変異を獲得しやすい性質を有することが示唆された。また一般的に FQ 系薬剤に非感性的となるためには QRDR におけるアミノ酸残基の置換が必要といわれているが、解析した CIP 非感性的肺炎桿菌の9株は QRDR に置換が認められず、こ

これらの株は PMQR の獲得に加えて膜の変化などが合わさって非感性を獲得したと考えられる。今後これらの株は大腸菌 ST131 のようにわが国でも多剤耐性株として広がる可能性があり、その場合には選択可能な抗菌薬が極めて限定され、感染症の治療が困難になることが懸念される。そこで、この種の遺伝型の株がさらに拡散しないように厳重に監視する必要がある。

【結論】

日本におけるセファロスポリン耐性かつ FQ 非感性肺炎桿菌 29 株のうち 48.2%が 4 つの ST もしくは CC (ST37, CC17, ST11, CC528) に収束した。今後、国内におけるこれらの遺伝型の耐性株の動向を監視する必要がある。