

学 位 論 文 要 旨

氏 名

江田 諒太郎



論 文 題 目

「カルバペネマーゼをコードする薬剤耐性プラスミドによる
臨床および病院排水におけるカルバペネマーゼ IMP-1 の拡散」

指 導 教 授 承 認 印

北里 英郎



カルバペネマーゼをコードする薬剤耐性プラスミドによる
臨床および病院排水におけるカルバペネマーゼ IMP-1 の拡散

氏 名 江田 諒太郎

【背景と目的】

臨床現場や環境での薬剤耐性 (antimicrobial resistance: AMR) の増加は、世界的な公衆衛生上の脅威となっており、世界保健機関は AMR を 21 世紀の人類が直面する最も重要な脅威の一つとして認識している。感染症治療における重要な薬剤の一つであるカルバペネム系抗菌薬を不活化するカルバペネマーゼの世界的な拡散は、AMR の中でも特に重要視されている。カルバペネマーゼの世界的拡散の背景には、カルバペネマーゼ遺伝子の多くがプラスミド上にコードされていることが要因のひとつである。このため、菌株クローン伝播のみならず接合によるプラスミドの水平伝播が起こりうる。日本では IMP 型カルバペネマーゼが広く臨床現場で検出されており、その他の種類は散発例に留まっている。

AMR の問題は臨床の現場でのみ着目されてきたが、薬剤耐性菌や抗菌薬はヒト以外の分野、畜産業や河川などからも検出されることが報告されており、One Health Approach の考え方が定着した。特に水環境において排水や下水処理場は、AMR 遺伝子の貯蔵庫や環境供給源となることが示唆されている。さらに、これらの環境は沈殿槽の存在、富栄養、曝気環境により、細菌同士の AMR 遺伝子の水平伝播のホットスポットであると指摘されている。一方で、本邦では上下水道が完備されているため、病院排水をはじめとした水環境の AMR 調査およびその詳細な解析が諸外国に比べ進んでいないのが現状である。

そこで本研究では、本邦の AMR の拡散実態を明らかにすることを目的として、本邦の病院由来臨床分離株および病院排水由来株から広域スペクトラムセファロsporin (extended-spectrum cephalosporin: ESC) 耐性グラム陰性菌を収集し、臨床的に問題となっているカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (carbapenemase-producing Enterobacterales: CPE) に焦点を当てて解析した。さらに、日本の臨床および環境に広まっている IMP 型カルバペネマーゼの拡散ルート的一端を明らかにすることを目的として、研究期間内に検出した IMP 型カルバペネマーゼ産生菌の保有するプラスミドのゲノム情報ならびに伝達特性を解析した。これにより、日本の病院排水における AMR 汚染の現状を明らかにし、これらの AMR 細菌が人の健康や水環境の生態系に悪影響を及ぼす可能性を示した。

【材料と方法】

1. 菌株の集積

1-1. 北里大学病院由来臨床分離株

2006 年から 2018 年の期間で北里大学病院より分離された腸内細菌科細菌のうち、以下のいずれかの耐性を示す、広域スペクトラム β -ラクタム薬耐性株を収集した。①セフトジジム MIC \geq 8 μ g/mL②イミペネム MIC \geq 2 μ g/mL かつセフメタゾール MIC \geq 64 μ g/mL③メロペネム MIC \geq 2 μ g/mL④セフェピム MIC \geq 4 μ g/mL かつセフメタゾール MIC \geq 16 μ g/mL。

1-2. 病院排水由来環境分離株

関東地方に位置する病院 1 施設の病院排水を 2018 年 10 月から 2020 年 1 月の期間で 5 回採水した。ESC 耐性グラム陰性桿菌を選択分離するため、10 倍段階希釈後に 2 µg/mL セフトリアキソン含有 DHL 培地にプレーティングした。発育したシングルコロニーを全数計測し、生菌数を算出した。シングルコロニーを全数 MALDI biotyper を使用して菌種の同定を行った。

2. カルバペネマーゼ遺伝子および基質拡張型 β-ラクタマーゼ (extended-spectrum β-lactamase: ESBL) 遺伝子の検出

ESC 耐性グラム陰性桿菌を対象に改良 CIM 法を用いてカルバペネマーゼの検出を行った。さらに、PCR および DNA シーケンスを行い、重要な β-ラクタマーゼ遺伝子を対象に検出した。対象遺伝子を以下に示す。カルバペネマーゼ：IMP、VIM、KPC、NDM、OXA-48 like、GES (排水のみ)；ESBL (排水のみ)：TEM、SHV、OXA-1、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-9 group、CTX-M-8/25 group。

3. CPE のドラフトゲノム解析

HiSeq および NovaSeq を使用して CPE の全ゲノム解析を行った。シーケンスライブラリの調製には Nextera XT DNA Library Prep Kit を使用した。得られたドラフトゲノムから Multilocus sequence typing (MLST) 解析、系統樹解析を行うことで、CPE 菌株の疫学解析を行った。さらに、薬剤耐性遺伝子とプラスミドレプリコン遺伝子を CGE サーバー上でそれぞれ ResFinder v3.2 と PlasmidFinder v2.1 で検出し、CPE 菌株の特徴付けを行った。プラスミドの完全ゲノムは MinION を併用したハイブリッドアセンブリで取得した。

4. 接合伝達能解析

カルバペネマーゼ産生菌に関して、他菌種へのプラスミド伝達能を測定するため接合伝達試験を行った。Plate mating 法または Liquid mating 法で計測し、伝達の有無および接合伝達頻度を算出した。プラスミド受容菌には *Escherichia coli* ATCC BAA-2731、*Enterobacter cloacae* ATCC23355 を使用した。

【結果と考察】

1. 対象菌株の集積およびカルバペネマーゼの検出

1-1. 北里大学病院臨床分離株におけるカルバペネマーゼ産生菌の存在実態

対象期間に広域スペクトラム β-ラクタム薬耐性腸内細菌目細菌 853 株から 42 株の CPE が検出され、それぞれ 2006 年 (n=2)、2011 年 (n=4)、2012 年 (n=1)、2014 年 (n=2)、2015 年 (n=3)、2016 年 (n=8)、2017 年 (n=12)、2018 年 (n=10) に臨床分離された株であった。カルバペネマーゼの内訳は IMP-1 が 39 株 [*Citrobacter freundii* (n=3)、*Cronobacter sakazakii* (n=1)、*Klebsiella pneumoniae* (n=4)、*E. cloacae* complex (n=31)]、NDM-5 が 3 株 [*E. coli* (n=3)] であった。

1-2. 関東地方に位置する病院由来の環境排水由来 ESC 耐性菌の存在実態

対象期間の中で 575 株の ESC 耐性グラム陰性菌を分離同定した。その中でも *Aeromonas* 属が多数を占めた (76.5%, n=441)。また、118 株 (20.5%) が腸内細菌科細菌 [*Klebsiella* 属 (11.5%, n=64)、*Enterobacter* 属 (n=32)、*Citrobacter* 属 (n=11)、*E. coli* (n=6)、*Kluyvera* 属 (n=1)、*Raoultella* 属 (n=4)] と同定され、*Klebsiella* 属が *Aeromonas* 属に次いで 2 番目に多い菌種であった。これらの傾向は研究期間を通じてほぼ一貫しており、排水中の ESC 耐性菌の推定濃度は、2018 年 10 月に 8.1×10^4 CFU/mL、2019 年 4 月に 4.0×10^4 CFU/mL、2019 年 7 月に 8.7×10^4 CFU/mL、2019 年 11 月に 1.5×10^5 CFU/mL、2020 年 1 月に 4.0×10^5 CFU/mL、平均 1.5×10^5 CFU/mL であった。

5 回のサンプリング日から計 59 株のカルバペネマーゼ産生菌が検出された [2018 年 10 月 (n=21)、2019 年 7 月 (n=32)、2019 年 11 月 (n=6)]。そのうち 58 株 [*Aeromonas caviae* (n=53)、*E. cloacae* complex (n=2)、*Citrobacter braakii* (n=1)、*C. freundii* (n=2)] が *bla*_{IMP-1} を保有していた。MLST 解析の結果、これらの IMP-1 産生腸内細菌目細菌の *E. cloacae* complex (n=2)、*C. braakii* (n=1)、*C. freundii* (n=2) はそれぞれシーケンスタイプ 32 (ST32)、ST110、ST396 に属していた。さらに、病院排水中での存在が明らかになった GES 型 β -ラクタマーゼは保有している菌種が広く、また複数年度に渡り多くの菌種から検出され続けていることから、今後、臨床現場で高頻度に出現することが危惧された。

2. 臨床からおよび排水から分離された IMP-1 産生 *E. cloacae* の疫学解析

対象期間に 42 株の CPE から 31 株、病院排水から 2 株の合計 33 株の IMP-1 産生 *E. cloacae* complex が得られた。近年、同様の特徴を持つ *E. cloacae* の報告数が増加しており、関東地域でのクローナルな拡散が示唆されている。臨床分離株は、それぞれ 2011 年 (1/31)、2012 年 (1/31)、2015 年 (2/31)、2016 年 (5/31)、2017 年 (12/31)、2018 年 (10/31) に分離されたものであった。全ての *E. cloacae* complex 分離株は MLST 解析により、ST25 (3.0%, 1/33)、ST32 (6.1%, 2/33)、ST78 (9.1%, 3/33)、ST116 (24.2%, 8/33)、ST133 (27.3%, 9/33)、ST719 (24.2%, 8/33)、新規 ST (6.1%, 2/33) に属することが明らかになり、系統樹解析ではこれらの分離株は遺伝的に異なる 7 つのグループに分類された。これらのグループの多くは関東地方で報告されている菌株のゲノム背景と異なる背景を持つことから、菌株クローンによる拡散ではなくプラスミドを介した拡散が示唆された。

3. ドラフト解析からみた、臨床および病院排水から検出された IMP-1 産生菌の遺伝的背景の相同性と伝達特性

臨床分離株由来の IMP-1 産生菌株はカルバペネマーゼ遺伝子に加えて *bla*_{ACT} (53.8%, 21/39)、*aac*(6')-IIc (94.9%, 37/39)、*fosA* (82.1%, 32/39)、*qnrB6* (89.7%, 35/39)、*sulI* (100%, 39/39)、*tetB* (92.3%, 36/39) などの薬剤耐性遺伝子を同時に保有していた。さらに、ほとんどの株が IncHI2 (92.3%, 36/39) および IncHI2A (92.3%, 36/39) プラスミドレプリコンを保有していた。一方で、病院排水由来の IMP-1 産生菌株はカルバペネマーゼ遺伝子に加えて *bla*_{ACT} (40%, 2/5)、*bla*_{CMY} (60%, 3/5)、*aac*(6')-IIc (100%, 5/5)、*fosA* (40%, 2/5)、*qnrB6* (80%, 4/5)、*sulI* (100%, 5/5)、*tetB* (60%, 3/5) などの臨床分離株と同様な薬剤耐性遺伝子を保有していた。薬剤耐性遺伝子との

関連は不明であったが、最も保有率の高かったプラスミドレプリコンタイプは IncFIB(K) (80.0%, 4/5) であり、臨床で検出頻度の多い IncHI2 および IncHI2A レプリコンが次いで検出された (60%, 3/5)。これらの薬剤耐性遺伝子を指標とした特徴は菌種を越えて臨床分離株と病院排水由来株で非常に類似していることから、臨床分離株が保有する *bla*_{IMP-1} を含む薬剤耐性遺伝子カセットをコードした IncHI2 プラスミドが病院排水中に拡散・蔓延していることが示唆された。そこで *bla*_{IMP-1} をコードした IncHI2 プラスミドの完全ゲノム配列を取得し、比較解析を行った。結果、これらのプラスミドは高い類似性を有しており、*bla*_{IMP-1} は *aac(6)-IIC* ならびに *qacEΔ1*, *sul1* を含むクラス I インテグロン内にコードされていることが明らかになった。また、これらのプラスミドは重金属イオン耐性遺伝子群を複数有していた。さらに、本研究で明らかになったプラスミド構造は、本邦で報告されている *bla*_{IMP-1} をコードする IncHI2 プラスミドとも高い類似性を有していた。これらの結果から、*bla*_{IMP-1} の拡散には特有のプラスミドが拡散しているだけでなく、それ自身を含む特徴的な遺伝子カセットが菌種やプラスミド種を越えて拡散していることが示唆された。

さらに、プラスミドを介した *bla*_{IMP-1} の拡散について接合伝達試験を用いて解析を試みた。臨床分離 IMP-1 産生株から他菌種への伝達解析では、多くの IncHI2 プラスミドが *E. coli* および *E. cloacae* に伝達を認めない一方で、高頻度に *E. coli* に伝達する IncA/C プラスミドの存在が確認された。また、病院排水由来 CPE 菌株から他菌種への伝達解析では、5 株の CPE うち 3 株 [*E. cloacae* complex (n=2)、*C. braakii* (n=1)] において *E. coli* への *bla*_{IMP-1} の伝達を確認された。

【結論】

以上の結果は、臨床で問題となっているカルバペネマーゼ遺伝子がプラスミドを介して日本の水環境に広がっていることを示唆している。*bla*_{IMP-1} は関東地域の主要なカルバペネマーゼであるが、日本の水環境では今まで検出されていなかった。カルバペネマーゼ産生菌に感染もしくは保菌した患者は排泄物を介して *bla*_{IMP-1} を排水環境中に拡散させ、さらに、それらのカルバペネマーゼ産生菌が病院排水中で耐性遺伝子のリザーバーおよび環境細菌への耐性プラスミド水平伝播のベクターとなっていることが推察される。病院排水の AMR モニタリングは環境中で進行中の AMR 拡散の検出に寄与し、臨床現場や環境コミュニティでの潜在的な AMR 拡散を早期に警告することができる。