

論文内容要旨

Evolution of a novel IMP-6 producing *P. aeruginosa*
in a long-term care facility in Japan

(わが国の長期療養型医療施設で出現した新たな
IMP-6 産生緑膿菌)

主指導教員：菅井 基行客員教授
(医系科学研究科 薬剤耐性学)

副指導教員：坂口 剛正教授
(医系科学研究科 ウイルス学)

副指導教員：鹿山 鎮男客員准教授
(医系科学研究科 薬剤耐性学)

池田 光泰

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【概要】

ある長期療養型医療施設（LTCF）で発生した薬剤耐性菌（ARB）アウトブレイクを調査する過程で、我が国で初めての IMP-6 産生 *Pseudomonas aeruginosa* を検出した。LTCF では患者 24 名の保菌調査、環境調査から 140 株の ARB（患者由来 86 株、環境由来 54 株）を得た。その中で 59 株が *bla*_{IMP-6} を保有しており、うち一株は *P. aeruginosa* であった。*bla*_{IMP-6} 保有 *P. aeruginosa* TC16G のゲノム解析の結果、TC16G 株は ST235 で *bla*_{IMP-6} を含むインテグロンを染色体上に保有していた。この *bla*_{IMP-6} integron 上のアミノグリコシド耐性遺伝子 *aacA4* は既報の *bla*_{IMP-6} integron 上の *aacA4* と比較して一塩基多型を有していることが分かった。この一塩基多型は LTCF 内で分離された全ての *bla*_{IMP-6} 保有カルバペネマーゼ産生菌（CPO）で認められた。一方、広島県内の 12 施設を対象としたサーベイランスで分離された 84 株の *bla*_{IMP-6} 保有 CPO のうち、急性期病院 1 施設から分離された 2 株のみがこの一塩基多型を有していた。また、2011 年に近畿地区の急性期病院において、分離された 1 株の CPO がこの一塩基多型を有することが明らかとなった。*bla*_{IMP-6} 保有プラスミドのコアゲノム系統樹による解析の結果、近畿地区で分離された CPO が保有するプラスミドと LTCF から検出されたプラスミドは同一クラスターに分類された。LTCF で患者喀痰検体から分離されたカルバペネマーゼ非産生 *P. aeruginosa* (ST235) と *bla*_{IMP-6} 保有 *E. coli* を用いて接合伝達実験を行い、*bla*_{IMP-6} integron が *P. aeruginosa* の染色体上に伝達されることを確認した。以上のことから *bla*_{IMP-6} プラスミドが近畿地区の急性期病院から広島県の LTCF の中に入り込み、*bla*_{IMP-6} 保有 CPO として院内感染をおこし、患者腸管内で *bla*_{IMP-6} integron が *P. aeruginosa* に伝達され、新たな IMP-6 産生 *P. aeruginosa* を生み出したことが強く示唆された。

【対象・方法】

2017 年 6 月に小規模 LTCF（一般病床 50 床、療養病床 60 床）にて 24 名の入院患者を対象に喀痰、尿、便を採取し保菌調査を行った。また各フロアの処置室のシンクや排水溝を中心に計 40 ヶ所から環境サンプルを採取した。サンプリングしたスワブおよび検体は CHROMagar™ ESB� および CHROMagar™ mSuperCARBA™ を用いてスクリーニングした。菌種同定・薬剤感受性試験は、RAISUS S4 を用いた。PCR により各種 β-ラクタマーゼ遺伝子を検出した。菌株の相同性の比較するためにパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を用いた。Illumina リードと MinION により得られたゲノムデータから Multilocus sequence typing (MLST) および薬剤耐性 (AMR) 遺伝子を検索し、プラスミドおよび全ゲノムを比較した。

【結果・考察】

スクリーニングにより、患者 24 人中 23 人、および病院環境 40 ヶ所中 20 ヶ所から計 140 株の ARB を検出した。PCR を用いて解析した結果、7 菌種 67 株の CPO および 5 菌種 20 株の基質拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生株 (CP 同時産生株は除く) を検出した。検出したカルバペネマーゼ遺伝子は、*bla*_{IMP-1} : 6 株、*bla*_{IMP-6} : 59 株、*bla*_{TMB-1} : 2 株であった。*P. aeruginosa* からも *bla*_{IMP-6} を 1 株検出した。51 株の *bla*_{IMP-6} 保有 CPO を *bla*_{IMP-6} プラスミド pKPI-6 をリファレンスとして比較した結果、50 株の *bla*_{IMP-6} を含む DNA はプラスミド全体にマッピングさ

れたが、*P. aeruginosa* TC16G (ST235) は *bla*_{IMP-6} integron のみがマッピングされた。また *bla*_{IMP-6} integron 領域の塩基配列を詳細に解析した結果、*bla*_{IMP-6} の上流に位置する *aacA4'*-3 に pKPI-6 の *aacA4'*-3 と異なる 1 塩基多型 (C305T) を認めた。この一塩基多型は LTCF 内で分離された全ての *bla*_{IMP-6} を有する CPO が保有していた。一方で、広島県内の 12 施設を対象として院内感染症プロジェクト研究センターが 2009 年から実施してきた ESBL 産生菌・CPO サーベイランスで分離された 84 株の *bla*_{IMP-6} 保有 CPO と近畿地区で 2006-2011 年に分離された *bla*_{IMP-6} 保有 CPO を調べた結果、広島県内の他施設では 1 施設の急性期病院 (B Hospital) からのみ 2016, 2017 年に 2 株の一塩基多型が検出された。また、この一塩基多型は近畿地区の急性期病院 (A Hospital) から 1 株のみ検出された。pKPI-6 をリファレンスとして *bla*_{IMP-6} 保有プラスミドとのコアゲノム系統樹による解析を実施した結果、B Hospital から 2016 年に検出された株は LTCF とは別のクラスターに属していたが、2017 年に B Hospital から検出された株と近畿由来 A Hospital から検出された株は LTCF と同じクラスターに属していた。*bla*_{IMP-6} の保有が確認された *P. aeruginosa* TC16G の *bla*_{IMP-6} integron の周辺構造を解析した結果、*P. aeruginosa* P34 株 の染色体 (accession no. CP032552) と構造が類似し、*bla*_{IMP-6} integron は染色体上の領域に組み込まれていることが明らかとなった。また、TC16G 株の *bla*_{IMP-6} integron の上流には *tnpR* および *tnpA* を認めた。TC16G 株の *bla*_{IMP-6} integron の脱落の可能性を評価するために、TC16G 株を 10 回継代培養した培養液を培地に撒き、発育したコロニーを解析した結果、99% (99/100 コロニー) は *bla*_{IMP-6} integron を保持していた。*bla*_{IMP-6} integron の染色体上への組み込みを実証するために、LTCF 内で患者喀痰検体から分離されたカルバペネマーゼ非産生 *P. aeruginosa* PC08S (ST235) と *bla*_{IMP-6} 保有 *E. coli* を用いて接合伝達実験を行った。その結果、*bla*_{IMP-6} integron は 2.8×10^{-7} の頻度で接合伝達した。PC08S 株および PC08S transconjugant 株の *bla*_{IMP-6} integron の周辺構造を解析した結果、*bla*_{IMP-6} integron のみが PC08S 株の染色体上に組み込まれていた。TC16G 株と実験的に作成した PC08S transconjugants 株のゲノム配列比較の結果、TC16G 株と PC08S 株は染色体上に各々二つの *tnpR*, *tnpA* 配列を保有し、PC08S transconjugant 株は TC16G 株の *tnpA* とは異なる *tnpA* の下流に挿入されていることが明らかとなった。

【結論】

分子疫学的手法を用いて、LTCF 内での保菌調査および環境調査により、耐性菌の広がりを解析した。*bla*_{IMP-6} integron の一塩基置換により一連の耐性遺伝子の時間的・空間的広がりを検証した。*P. aeruginosa* は、おそらく患者腸管内で *bla*_{IMP-6} 保有 CPO から染色体上に *bla*_{IMP-6} integron を獲得し、安定して耐性を示す IMP-6 産生 *P. aeruginosa* を生み出したと考えられる。本研究は耐性菌の蔓延化した環境下では水平伝播により新たな耐性菌が出現することを示した。新たな耐性菌の出現を防ぐためには、LTCF での耐性菌動向の監視、感染制御が非常に重要であると考えられる。