

全文要約

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

by MITSUYASU IKEDA

Thesis Director:

Dr. Motoyuki Sugai

2017年6月、広島県内のある長期療養型医療施設（LTCF）の入院患者からカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（CRE）が検出された。その患者は無症状でCREの保菌者であった。その後、広島大学 院内感染症プロジェクト研究センターがLTCFでのCREの分子疫学的なサーベイランスを実施することになった。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カ所から環境サンプルを採取した。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カ所中20カ所から計140株の薬剤耐性菌（ARB）を検出した。PCRを用いて解析した結果、7菌種67株のカルバペネマーゼ産生菌（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（カルバペネマーゼ同時産生株は除く）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。*Pseudomonas 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とは異なる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 (nt 2,489,981~nt 2,498,421) 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} 保有大腸菌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。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。