

課題番号 : 29指定5
研究課題名 : ネパールの医療施設で分離される多剤耐菌の分子疫学解析および診断法の開発
主任研究者名 : 森岡 慎一郎
分担研究者名 : 森岡 慎一郎、竹本 訓彦

キーワード : Nepal, 薬剤耐性グラム陰性菌、分子疫学解析
研究成果 :

種々の薬剤耐性菌が医療施設を中心に新興し、地球規模で拡大している (Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2015: WHO)。ネパールの医療施設では薬剤耐性菌の蔓延が危惧されているが、その実態は明らかになっていない。本研究の目的は、ネパールの医療施設における流行性の薬剤耐性因子を同定し、薬剤耐性グラム陰性菌の実態を明らかにし、さらに全ゲノム解析による分子疫学の有効性を実証することである。このために、ネパールのトリブバン大学医学部附属教育病院と共同で多剤耐性グラム陰性細菌の分子疫学解析を実施した。

本年度は2016年から2017年年度にネパールで分離された多剤耐性グラム陰性菌100株を得た。また、ネパールで分離した多剤耐性緑膿菌から新規のアミノグリコシド高度耐性因子 RmtF2 を同定し、Antimicrob Agents Chemother に報告した。さらに、カルバペネム耐性大腸菌38株の全ゲノム解析を実施し、ネパールでは市中感染型の大腸菌 ST648 株がカルバペネム耐性因子 NDM-1 および高度アミノグリコシド耐性因子 ArmA、RmtB および RmtC を獲得し、院内感染起因菌となっていることを明らかにし、Antimicrob Agents Chemother に報告した。現在、残りの CRE の菌種同定および薬剤感受性プロファイルを作成するとともに、ゲノム解析を行っている。

Subject No. : 29-S-5
Title : Molecular epidemiology of multidrug-resistant clinical isolates and development of diagnostic systems in Nepal
Researchers : Shinichiro Morioka
Key word : Nepal, Drug-resistant Gram-negative bacteria, Molecular epidemiology, Rapid diagnosis
Abstract :

Many reports indicate that there are emerging bacterial strains of which many common antibiotics are ineffective. These multidrug-resistant bacteria continue to spread quickly at medical settings, on a global scale, and there is no sign of slowing down (Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2015: WHO). Although the medical settings in Nepal have been feared spread of multidrug-resistant bacteria, the actual situation has not been at all. It is necessary to develop a foundational research laboratory in Nepal for molecular epidemiology of drug-resistant bacteria in Nepal.

We obtained 100 multidrug-resistant Gram-negative pathogens obtained from 2016 to 2017 in medical settings in Nepal. A total of 11 multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates were obtained in a medical setting in Nepal. Four of these isolates harbored genes encoding one or more carbapenemases (DIM-1, NDM-1, and/or VIM-2), and five harbored genes encoding a 16S rRNA methyltransferase (RmtB4 or RmtF2). A novel RmtF variant, RmtF2, had a substitution (K65E) compared with the same gene in RmtF. We reported the results in *Antimicrob Agents Chemother* (Tada et al, 2017 Aug 24;61. pii: e00694-17).

A total of 38 carbapenem-resistant *Escherichia coli* clinical isolates, with MICs of imipenem or meropenem of ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$, were obtained in medical settings in Nepal. All 38 isolates harbored the following bla_{NDMs} : $bla_{\text{NDM-1}}$, $bla_{\text{NDM-3}}$, $bla_{\text{NDM-4}}$, $bla_{\text{NDM-5}}$, $bla_{\text{NDM-7}}$, $bla_{\text{NDM-12}}$, and $bla_{\text{NDM-13}}$. Most of these isolates also harbored the 16S rRNA methylase gene(s) *armA*, *rmtB*, and/or *rmtC*. We reported the results in *Antimicrob Agents Chemother* (Shrestha et al, 2017 Nov 22;61. pii: e01425-17).

課題番号 : 29指定5

研究課題名 : ネパールの医療施設で分離される多剤耐菌の分子疫学解析および診断法の開発

主任研究者名 : 森岡 慎一郎

ネパールで分離された多剤耐性緑膿菌から16S rRNAメチラーゼRmtFの新規バリエーションRmtF2が同定

RmtF	1	MDERAQAALDALLSAKNLRDVCPEVRRVFMELLPRYRKPDAEKAARTHLHQITGAFMT	60
RmtF2	1	MDEHQAALDALLSAKNLRDVCPEVRRVFMELLPRYRKPDAEKAARTHLHQITGAFMT	60
RmtF	61	ADAEKAKARALLARWNEGDESALAAALSLHASTRERLPGADEWMRRVSPFLGADARVLDLA	120
RmtF2	61	ADAEKAKARALLARWNEGDESALAAALSLHASTRERLPGADEWMRRVSPFLGADARVLDLA	120
RmtF	121	CGLNPILLGSMGVTNALGMDIHLGCVRLVNETARARGWHTRARACDLLSEIPAEEDAAL	180
RmtF2	121	CGLNPILLGSMGVTNALGMDIHLGCVRLVNETARARGWHTRARACDLLSEIPAEEDAAL	180
RmtF	181	LMKLLPVLEAQKTGRAAELLASLRAPRLVVTFPTRTLGGRGVGMKHYADWFERILPDTL	240
RmtF2	181	LMKLLPVLEAQKTGRAAELLASLRAPRLVVTFPTRTLGGRGVGMKHYADWFERILPDTL	240
RmtF	241	SVDRFTVSDELVYLVERT	259
RmtF2	241	SVDRFTVSDELVYLVERT	259

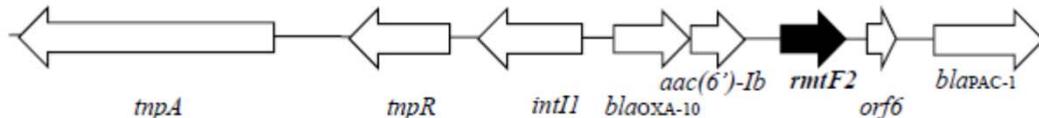
65番目のアミノ酸がリシンからグルタミン酸に変異

新規rmtF2遺伝子の周辺構造

Genomic environment surrounding *bla_{DIM-1}* in IOMTU133 (accession no. AP017302)



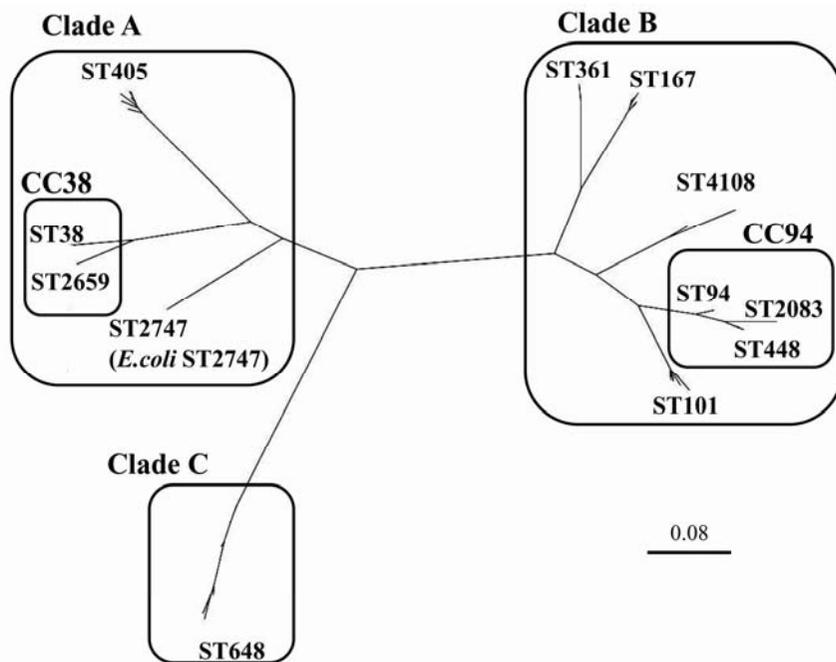
Genomic environment surrounding *rmtF2* in IOMTU 184 and IOMTU487 (accession no. LC224309)



2種類の周辺構造の存在が明らかとなった

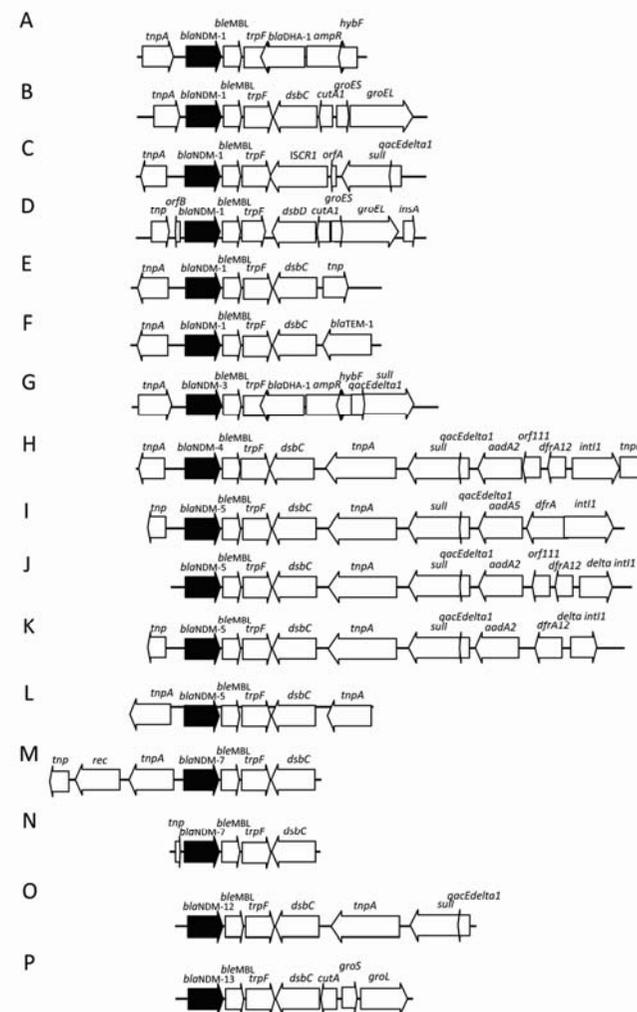
ネパールの医療施設から分離されたカルバペネム耐性大腸菌の解析

SNPベースの分子系統解析の結果



大きく分けて3つのCladeに分かれた。
市中感染菌として知られているST648がClade Cに見られ、
院内感染菌としてカルバペネム耐性因子 *bla*_{NDM} を獲得し、
進化していることが明らかとなった。

*bla*_{NDMs} の周辺構造



様々な *bla*_{NDM} 周辺構造をもったプラスミドが存在していることが明らかとなった。

課題番号 : 29指定5
研究課題名 : ネパールの薬剤耐性菌分離株のゲノム解析に関する研究
分担研究者名 : 森岡 慎一郎

キーワード : Nepal, 薬剤耐性グラム陰性菌、分子疫学解析
研究成果 :

種々の薬剤耐性菌が医療施設を中心に新興し、地球規模で拡大している (Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2015: WHO)。ネパールの医療施設では薬剤耐性菌の蔓延が危惧されているが、その実態は明らかになっていない。本研究の目的は、ネパールの医療施設における流行性の薬剤耐性因子を同定し、薬剤耐性グラム陰性菌の実態を明らかにし、さらに全ゲノム解析による分子疫学の有効性を実証することである。このために、ネパールのトリブバン大学医学部附属教育病院と共同で多剤耐性グラム陰性細菌の分子疫学解析を実施した。

本年度は2016年から2017年年度にネパールで分離された多剤耐性グラム陰性菌100株を得た。ネパール側共同研究者が保存した菌体入りカジトンメディウムを国立国際医療研究センターに移送し、菌体分離を行った。分離した菌株の薬剤耐性プロファイルを決定するため、 β -ラクタム剤としてペニシリン、アンピシリン、アンピシリン/スルバクタム、セフトチジム、セフトキシム、セフェピム、アズトレオナム、イミペネムおよびメロペネム、アミノグリコシド系薬としてアミカシン、アルベカシンおよびゲンタマイシン、キノロン系薬としてシプロフロキサシンおよびレボフロキサシン、その他の薬剤としてコリスチンおよびチゲサイクリンを用いて最小発育阻止濃度を決定した。これらの薬剤耐性プロファイルとゲノムデータのすり合わせを実施した。分離された薬剤耐性菌から大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌およびアシネトバクター属菌からカルバペネム耐性因子であるNDM型メタロ- β -ラクタマーゼ高度アミノグリコシド耐性に関与する16S rRNAメチラーゼ産生因子が多数検出され、その中から新規のRmtFバリエーションRmtF2が同定された。

課題番号 : 29指定5
研究課題名 : ネパールの薬剤耐性菌分離株のゲノム解析に関する研究
分担研究者名 : 竹本 訓彦

キーワード : Nepal, 薬剤耐性グラム陰性菌、分子疫学解析
研究成果 :

本年度は2016年から2017年年度にネパールで分離された多剤耐性グラム陰性菌100株を得た。ネパール側研究者が保存した菌体保存用カジトンメディウムから菌体をアイソレートした。これらアイソレートされた菌株からゲノムを抽出し、次世代シーケンサ(MiSeq, Illumina)により全ゲノムを決定し、CLC Genomics Workbenchによりリード配列のアセンブルを行った。アセンブルした配列をもとに16S rRNAによる菌種同定およびResFinderによる薬剤耐性因子の抽出を行った。

その結果、分離された薬剤耐性菌から大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌およびアシネトバクター属菌が分離された。多くの腸内細菌科細菌からカルバペネム耐性因子であるNDM型メタロ- β -ラクタマーゼが検出された。これらのNDM型メタロ- β -ラクタマーゼにはNDMs: NDM-1, NDM-3, NDM-4, NDM-5, NDM-7, NDM-12およびNDM-13といった様々なNDMバリエーションが含まれていた。また、多剤耐性緑膿菌から高度アミノグリコシド耐性に関与する16S rRNAメチラーゼ産生因子が検出され、その中から新規のRmtFバリエーションRmtF2が同定された。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指定5

研究課題名：ネパールの医療施設で分離される多剤耐性菌の分子疫学解析および迅速診断法の開発

主任研究者名：森岡 慎一郎

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Miyoshi-Akiyama T, Tada T, Ohmagari N, Viet Hung N, Tharavichitkul P, Pokhrel BM, Gniadkowski M, Shimojima M, Kirikae T.	Genome Biol Evol.	9(12)	2017
Emergence of Various NDM-Type-Metallo- β -Lactamase-Producing <i>Escherichia coli</i> Clinical Isolates in Nepal.	Shrestha B, Tada T, Shimada K, Shrestha S, Ohara H, Pokhrel BM, Sherchand JB, Kirikae T.	Antimicrob Agents Chemother.	61(12)	2017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Clinical Isolates in Nepal Coproducing Metallo- β -Lactamases and 16S rRNA Methyltransferases.	Tada T, Shimada K, Satou K, Hirano T, Pokhrel BM, Sherchand JB, Kirikae T.	Antimicrob Agents Chemother.	61(9)	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
ネパールの医療施設で分離されたNDM型メタロ- β -ラクタマーゼ産生大腸菌	多田 達哉	日本細菌学会	福岡県	2018年3月
ネパールの医療施設で分離されたカルバペネム耐性大腸菌の分子疫学解析	多田 達哉	第46回薬剤耐性菌研究会	群馬県	2017年11月
日本およびアジアで進化する多剤耐性緑膿菌	多田 達哉	第100回日本細菌学会関東支部総会	東京都	2017年9月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。