

## 28. 集発が疑われたカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 のプラスミド解析による評価

○カール 由起、重村 洋明（福岡県保健環境研究所）

### 【研究目的】

カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）が保有するカルバペネマーゼ遺伝子の一致は、CPEの集発を疑う端緒となる。しかし、偶発的に遺伝子型が一致した可能性を排除できず、集発事例であるか判定に苦慮している。本研究は、カルバペネマーゼ遺伝子を保有するプラスミドの情報を付加することで、集発が疑われたCPEの関連性を評価するとともに、プラスミド解析手法の特性に応じた活用法の検討を目的とした。

### 【研究の必要性】

カルバペネム系抗菌薬は、難治性細菌感染症に対する最後の手段として用いられる。このため、カルバペネム系抗菌薬の分解酵素（カルバペネマーゼ）を産生する腸内細菌科細菌（CPE）の浸淫は、公衆衛生上の脅威である。我々は2017年から福岡県の医療機関で分離されたCPEを対象に保有するカルバペネマーゼ遺伝子の型別を行なっている。その中で、カルバペネマーゼ遺伝子が一致するCPEが同一医療機関から短期間に続けて分離されることがあり、集発を疑うことがある。しかし、これら情報だけでは、偶発的に遺伝子型が一致した可能性を排除できず、集発事例であるか判定に苦慮している。CPEの集発を判断するため、カルバペネマーゼ遺伝子型別に加え、詳細な解析手法を用いた評価が必要である。

カルバペネマーゼ遺伝子の多くはプラスミド上に存在している。プラスミドの解析を実施することで、共通する特徴をもつプラスミドの有無によりCPEの関連性を評価できる。本研究では、プラスミド情報を付加することで、集発が疑われたCPEの関連性を評価する。また、プラスミドの解析手法によって、迅速性や取得できるプラスミド情報が異なるため、解析手法の特性に応じた活用法を検討する。本研究により、CPEの集発をより正確に探知できれば、適切な感染対策の実施につながることを期待される。

### 【研究計画】

全ゲノムシーケンス（WGS）を応用したプラスミド解析は、プラスミド型、プラスミドサイズ、プラスミド上の薬剤耐性遺伝子等の情報をまとめて取得できる。そこで、まず、当該解析手法を用いて集発が疑われたCPEの関連性を評価する。次いで、評価した株に対し、その他プラスミド解析（PCR法を用いたプラスミド型別及びS1-ヌクレアーゼパルスフィールドゲル電気泳動（S1-PFGE））を実施し、解析手法の特性に応じた活用法を検討する。

## 【実施内容・結果】

### 1 実施内容

#### (1) 使用した菌株

2017年から2022年までに福岡県内の医療機関9施設（医療機関AからI）から収集したIMP-1産生CPE 27株を用いた。これら菌株は、集発が疑われた株（3施設：医療機関A、B及びC、各医療機関2株の計6株）、同一医療機関で検出時期が異なる株（3施設、14株）及び異なる医療機関で検出された株（6施設、7株）であり、同一医療機関で検出時期が異なる株及び異なる医療機関で検出された株は、比較対象として使用した。なお、同一医療機関で1か月以内に続けて分離された株を集発が疑われた株とした。

#### (2) WGSを応用したプラスミド解析

取得可能な塩基配列長が異なる2種類の次世代シーケンサー（MiSeq (illumina)及びMinION (Oxford Nanopore Technologies (ONT)))を用い、CPE株のゲノム塩基配列を取得した。MiSeqでの解析では、MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen)を用いてDNAを抽出した。その後、QIASeq Fx DNA Library Kit (Qiagen)にてライブラリ調整を行い、MiSeq Reagent Kit v3 600 cycle (illumina)を用いてゲノム塩基配列を取得した。MinIONでの解析では、QIAGEN Genomic-tips (Qiagen)を用いてDNAを抽出した。その後、Rapid Barcoding Kit SQK-RBK004 (ONT)にてライブラリ調整を行い、Flow Cell FLO-MIN106D (ONT)を用いてゲノム塩基配列を取得した。MiSeq及びMinIONから取得した配列データは、クオリティや配列長に基づきトリミングした後、Unicycler v0.5.0を用いてハイブリットアセンブリを行った。完全長を得た*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドは、PlasmidFinder 2.1及びResFinder 4.1を用い、プラスミド型及び薬剤耐性遺伝子を検索した。さらに、プラスミド型、サイズ及び保有する薬剤耐性遺伝子が類似した*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドは、DDBJ Fast Annotation and Submission Toolによるアノテーション後、Easyfig 2.2.5を用いて構造を比較した。

#### (3) プラスミド解析手法の活用法の検討

前述の1(2)で解析した株に対し、2種類のプラスミド解析（PCR法を用いたプラスミド型別及びS1-PFGE）を実施した。PCR法によるプラスミド型別は、PBRT 2.0 kit (DIATHEVA S. R. L.)を用い、WGSの結果から得られた*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドと同じ型を検出した場合を*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドの検出ありと判定した。また、S1-PFGEは、Benderらの方法<sup>1)</sup>を一部改変して実施した。作成したDNAプラグをS1 Nuclease (Thermo scientific)で処理後に電気泳動し、FluoroStain™ DNA 蛍光染色色素 (SMOBIO TECHNOLOGY, INC.)による染色の後、プラスミドDNAを検出した。そして、WGSの結果から得られた*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドと同程度のサイズのプラスミドバンドを検出した場合を*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドの検出ありと判定した。

### 2 結果

#### (1) WGSを応用したプラスミド解析

WGSを応用したプラスミド解析の結果、IMP-1産生CPE 27株のうち22株はプラスミド上に、2株は染色体上に*bla*<sub>IMP-1</sub>を保有していた。また、3株（集発が疑われた医療機関A

の1株を含む)は、*bla*<sub>IMP-1</sub>を保有する染色体あるいはプラスミドの完全長を取得できなかった。CPE 22株に由来する*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドの解析結果を表1に示した。本研究で検出した*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドは、プラスミド型、サイズ及びプラスミド上の薬剤耐性遺伝子により17種類に分類された。CPE 22株のうち1株は、*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドを2種類(IncFIB(K)/IncFII(K) hybrid及び型不明)保有していた。また、型不明の*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドを有するCPEが22株中12株(54.5%)と最も多かった。

医療機関Bにおいて、集発が疑われた2株(検出時期:2019年4月及び同年5月)は、表1に示すプラスミドNo. 16とNo. 10をそれぞれ保有していた。プラスミドサイズは異なるものの、ともにプラスミド型不明であり、プラスミド上の薬剤耐性遺伝子も一致したため、さらにプラスミドの構造を比較した(図1)。集発が疑われた2株に由来する*bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドは共通する構造を一部有していたが、異なる構造も多く認めた。一方、医療機関Bで検出時期が異なるCPE 3株(検出時期:2019年1月、2020年2月及び10月)に由来する型不明プラスミド(表1に示すプラスミドNo. 10及びNo. 13)と比較した結果、プラスミド全長にわたって構造が一致、あるいは、集発が疑われた2株間よりも共通する構造を多く認めた。また、異なる医療機関で検出されたCPE 6株(全て医療機関A)に由来する型不明プラスミド(表1に示すプラスミドNo. 11、12、14及び15)と比較した結果、これらプラスミドは共通する構造を一部有した(図1)。

表1 *bla*<sub>IMP-1</sub>保有プラスミドの解析結果

No.	プラスミド型	サイズ (bp)	<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> 保有プラスミド上の薬剤耐性遺伝子	菌株数	医療機関
1	IncC	149,120	<i>aac(6')-lb-cr, aac(6')-lb-Hangzhou, sulI, bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>qacE</i>	1	A
2	IncC	149,742	<i>aac(6')-lb-cr, aac(6')-lb-Hangzhou, sulI, bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>qacE</i>	1	A
3	IncC	149,777	<i>aac(6')-lb-cr, aac(6')-lb-Hangzhou, sulI, bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>qacE</i>	2	A
4	IncFIB(K)	199,865	<i>aadA5, aph(3')-XV, qnrS1, bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-101</sub>	1	G
5	IncM2	78,232	<i>aac(6')-lb-cr, aac(6')-lb-Hangzhou, aadA24, sulI, bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>qacE</i>	1	D
6	IncM2	82,206	<i>aac(6')-lb-cr, aac(6')-lb-Hangzhou, aadA24, sulI, bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>qacE</i>	2	C, F
7	IncFIA(HI1)/IncR hybrid	60,578	<i>aac(6')-lb-cr, aac(6')-lb-Hangzhou, aadA24, dfrA14, sulI, bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>qacE</i>	1	C
8	IncFIA(HI1)/IncR hybrid	78,891	<i>aac(6')-lb-cr, aac(6')-lb-Hangzhou, aadA24, dfrA14, sulI, qnrB9, bla</i> <sub>SHV-12</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>qacE</i>	1	H
9	IncFIB(K)/IncFII(K) hybrid	247,908	<i>aadA5, aph(3')-XV, bla</i> <sub>OXA-101</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	1	A
10	型不明	44,758	<i>aadA5, aph(3')-XV, bla</i> <sub>OXA-101</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	2	B
11	型不明	45,692	<i>aadA5, aph(3')-XV, bla</i> <sub>OXA-101</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	1	A
12	型不明	46,257	<i>aadA5, aph(3')-XV, qnrS1, bla</i> <sub>OXA-101</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	3	A
13	型不明	47,622	<i>aadA5, aph(3')-XV, bla</i> <sub>OXA-101</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	2	B
14	型不明	48,427	<i>aadA5, aph(3')-XV, bla</i> <sub>OXA-101</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	1	A
15	型不明	49,242	<i>aadA5, aph(3')-XV, bla</i> <sub>OXA-101</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	1	A
16	型不明	52,220	<i>aadA5, aph(3')-XV, bla</i> <sub>OXA-101</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	1	B
17	型不明	132,713	<i>aac(6')-lb-cr, aac(6')-lb-Hangzhou, aadA24, sulI, bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>qacE</i>	1	H

医療機関 C において集発が疑われた 2 株（検出時期：ともに 2020 年 8 月）は、表 1 に示すプラスミド No. 6 と No. 7 をそれぞれ保有しており、プラスミド型は異なった。

## (2) プラスミド解析手法の活用法の検討

表 1 に示す *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有プラスミドを有する CPE 22 株を対象とした。PCR 法によるプラスミド型別の結果、6 株 (27.3%) で *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有プラスミドを検出ありと判定した。検出した *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有プラスミドの型は、IncC、IncFIB(K)、IncFIB(K)/IncFII(K) hybrid であった。一方、IncM2、IncFIA(HI1)/IncR hybrid の IncFIA(HI1) 及び型不明のプラスミドは検出されなかった。PCR 法で確認できなかった IncM2 及び IncFIA(HI1)/IncR hybrid プラスミドについて、WGS を用いたプラスミド解析から得られた塩基配列を確認したところ、参照配列と比較して変異や欠失を認めた。S1-PFGE の結果、21 株 (95.5%) で *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有プラスミドと同程度のサイズのプラスミドバンドを検出した。

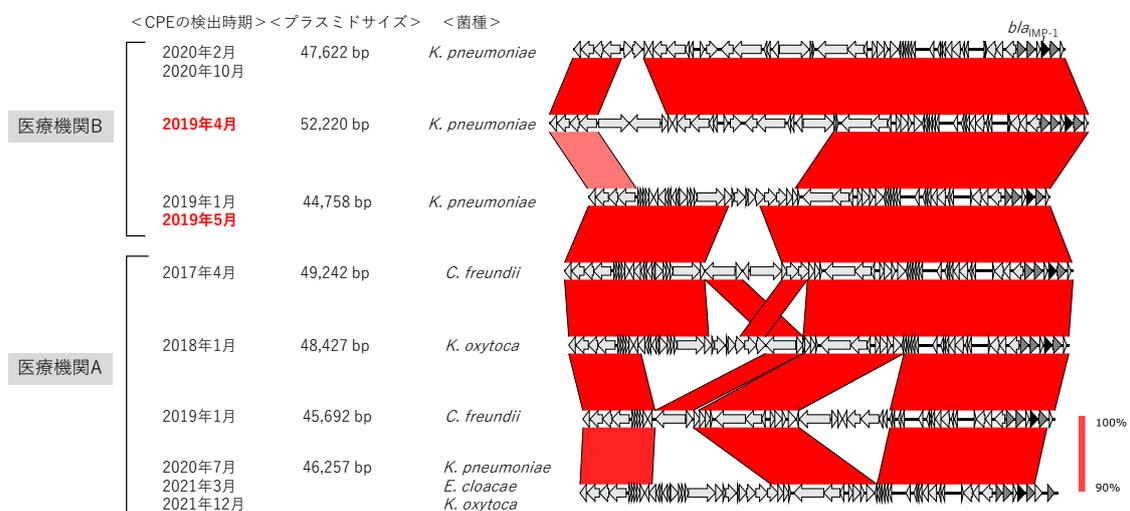


図 1 医療機関 A 及び B で検出されたプラスミド型不明 *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有プラスミドの構造比較

Open Reading Frame は矢印で示し、*bla*<sub>IMP-1</sub> は黒い矢印、その他の薬剤耐性遺伝子は灰色の矢印で示した。プラスミド構造の比較は図の上下に隣接しているプラスミド同士で実施した。一致している構造は配列相同性により右下のスケールの色で示した。集発が疑われた株の検出時期は赤字で示した。

## 【考察と今後の課題】

2013 年に国内で発生した IMP-1 産生 CPE による院内感染事例では、検出された CPE は全長にわたって構造がほぼ一致する *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有 IncL/M プラスミドを有していたことが報告されている<sup>2)</sup>。一方、本研究において医療機関 B で集発が疑われた株（検出時期：2019 年 4 月及び同年 5 月）に由来する *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有プラスミドは、共通する構造を一部有しているものの異なる構造を多く認めた（図 1）。また、医療機関 B で検出時期が異なる株（検出時期：2019 年 1 月、2020 年 2 月及び 10 月）に由来する *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有プラスミドと比較したところ、プラスミド全長にわたって構造が一致、あるいは、集発が疑われた 2 株間よりも共通する構造を多く有していた。さらに、医療機関 A において、共通する構造を一部有するプラスミドが検出された（図 1）。集発が疑われた 2 株は、疫学的関連もほとんど認められなかった。従って、福岡県においてプラスミド型不明の *bla*<sub>IMP-1</sub> 保有プラスミド（プラスミドサイ

ズ約 45,000bp) が挿入、欠失などの変化を伴いながら、特定の医療機関だけでなく地域に広がっており、当該プラスミドを保有する CPE が偶発的に医療機関 B において短期間に続けて分離された可能性が示唆された。

医療機関 C で集発が疑われた株については、*bIa<sub>IMP-1</sub>* 保有プラスミドのプラスミド型が異なることから、集発事例である可能性は低いことが示唆された。

PCR 法を用いたプラスミド型別は迅速性に優れた解析手法である<sup>3)</sup>。我々は当初、集発事例を早期探知するためのスクリーニングに用いることを想定していた。しかし、福岡県で分離される CPE に対しては、検出可能な *bIa<sub>IMP-1</sub>* 保有プラスミドは少なく (27.3%)、本県でのスクリーニングへの利用には不向きであると考えられた。当該法をスクリーニングに利用する際は、地域におけるカルバペネマーゼ遺伝子保有プラスミドの拡散実態を考慮する必要があると考えられた。

本研究では、S1-PFGE により、ほぼ全ての CPE 株 (95.5%) において *bIa<sub>IMP-1</sub>* 保有プラスミドを検出可能であった。S1-PFGE は、データ解析に要する時間まで含めると WGS による解析よりも短い検査日数で実施可能である。また、CPE が保有するプラスミドのサイズを目視で確認できるため、統一的な解析手法が未だ確立されていない WGS による解析<sup>4)</sup>の補助データとして有用である。従って、集発が疑われた CPE の関連性を評価する際は、S1-PFGE を先行して行い、同一集団事例の可能性が高い場合に WGS によるプラスミド解析を行う、あるいは、検査日数の観点から、人員に余裕があれば S1-PFGE と WGS による解析を並行して開始し、先に得られる S1-PFGE の結果を考慮して WGS による解析を継続するか判断するという検査フローが現時点では適していると考えられた。

本研究から、集発事例であるか評価する際は、疫学情報、プラスミド情報に加え、地域におけるカルバペネマーゼ遺伝子保有プラスミドの拡散実態を考慮する必要があると考えられた。より正確に CPE の集発を探知するため、今後、さらにカルバペネマーゼ遺伝子保有プラスミドの解析数を増やし、地域における拡散実態を把握する必要がある。

#### 【参考文献】

- 1) Bender, JB et al. N Engl J Med., 337:388-394, 1997.
- 2) 安部朋子ら, 日本臨床微生物学雑誌, Vol.27, No.3 2017.
- 3) Carattoli A, et al. J Microbiol Methods., Dec;63(3):219-28., 2005.
- 4) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 令和2年6月改訂版 Ver2.0

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費 1 (QIAGEN Genomic-tip, N-ラウロイルサルコシ酸ナトリウム 他)	59,400 円
消耗品費 2 (RNase A 他)	75,240 円
消耗品費 3 (QIAGEN Genomic-tip, Genomic DNA Buffer Set 他)	83,160 円
消耗品費 4 (DNA LoBind Tube, QIAGEN ProteinaseK, Buffer EB 他)	82,200 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円