

# 研究経過報告書

1. 研究課題名：
2. 研究代表者氏名：
3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

1. 第三次医療機関において分離された ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* の分子疫学的解析
2. 伊藤 渉
3. 2024 年 6 月 27 日 第 98 回日本感染症学会学術講演会  
「本邦の第三次医療機関で分離された ESBL 産生肺炎桿菌の分子疫学的特徴」

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

## 【方法】

### 菌株収集

2020 年 1 月から 2023 年 4 月までの期間に奈良県立医科大学附属病院で分離された *K. pneumoniae* を対象とした。各菌株は質量分析法により同定した。ESBL 産生の有無は VITEK 2 Advanced Expert System を用いてスクリーニングし、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のガイドラインに従った double disk synergy test 法にて確認した。研究期間中に 1 名の患者から ESBL 産生 *K. pneumoniae* (EPKp) が繰り返し分離された場合は、最初に分離された菌株のみを対象とした。

### 抗菌薬感受性試験

CLSI ガイドラインに従った寒天希釈法により、対象菌株における各種抗菌薬の薬剤感受性を測定した。最小発育阻止濃度は CLSI で規定されたブレイクポイントに従って解釈した。

### ESBL 遺伝子の検出と DNA 配列決定

PCR 法により CTX-M 型 ESBL 遺伝子を検索した。CTX-M 保有株については CTX-M-1、M-2、M-9、および M-8/25 グループのいずれかを決定した。CTX-M 非保有株については TEM、SHV、OXA-1like 遺伝子を検索した。得られた ESBL 遺伝子について DNA シーケンシングによる遺伝子型別を実施した。

### 接合伝達実験とプラスミド型別

EPKp を供与株、アジ化ナトリウム耐性大腸菌 J53 を受容株とした接合伝達実験により、ESBL 遺伝子の伝達性を検討した。伝達した ESBL 遺伝子は PCR 法で確認し、プラスミド型別を実施した。

### Multilocus sequence typing (MLST)

7 種のハウスキーピング遺伝子 (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) を用いて MLST を実施した。

## 【結果】

### 収集した菌株の特徴

研究期間中に分離された *K. pneumoniae* 1,074 株のうち、136 株が EPKp であり、119 株が本研究に使用可能であった。これらは尿 (n=37)、喀痰 (n=29)、血液 (n=27) およびその他の部位 (n=26) から分離された。MLST 解析により、EPKp 119 株から 42 種類の異なる ST が同定され、うち 1 種類は新規の ST (ST7647) であった。ST307 (n=60) が最も頻度の高い ST であり、次いで ST290 (n=7)、ST25、29、37、327 (n=3)、ST14、45、54、86 (n=2) であった。残り 32 種類の ST はそれぞれ 1 株ずつであった。2020 年から 2023 年までにおける ST307 の年間分離頻度は、それぞれ 35.3% (6/17 株)、31.0% (9/29 株)、63.9% (39/61 株)、50.0% (6/12 株) であった。

### ESBLの特徴

EPKp 119 株のうち 117 株が CTX-M 陽性、2 株が SHV 陽性であった。CTX-M 保有株のうち 92 株は CTX-M-1 グループ、22 株は CTX-M-9 グループ、3 株は CTX-M-2 グループであった。DNA シーケンシングの結果、CTX-M-15 (n = 90) が最も多く、次いで CTX-M-14 (n = 21) が多かった。CTX-M-15 保有株は 24 種類の異なる ST に分けられた。これらの ST のほとんどは、ST307 (n=60) を除き、各々 1~3 株であった。ST307 はすべての株が CTX-M-15 を産生した。SHV 保有株 2 株はいずれも SHV-2 を保有していた。

### ESBLの伝達性とプラスミド型別

接合伝達実験の結果、EPKp 119 株のうち 86 株において、ESBL をコードするプラスミドが大腸菌 J53 に伝達した。86 株中 4 株のプラスミドは型別を特定できなかった。CTX-M-15 または CTX-M-14 が伝達した株で最も頻度の高いプラスミドは IncFIIk レプリコンであった。IncFIIk を保有する CTX-M-15 産生 EPKp の 84.4% (54/64) は ST307 であった。

### 抗菌薬感受性

抗菌薬感受性試験の結果、EPKp 119 株すべてがセフトキシムに耐性を示し、クラバン酸で阻害され、イミペネムとメロペネムに感性であった。β-ラクタム系薬ではピペラシリン・タゾバクタム、セフトジジム、セフェピム、およびアズトレオナムの耐性率が ST307 において非 ST307 よりも高かった (それぞれ 17% vs 12%、93% vs 31%、68% vs 20%、および 98% vs 49%)。非β-ラクタム系薬ではレボフロキサシン、ホスホマイシン、ゲンタマイシン、およびアミカシンの耐性率が ST307 クローンで高かった (それぞれ 100% vs 19%、100% vs 95%、52% vs 36%、および 15% vs 0%)。

### 【考察と今後の展望】

奈良県立医科大学附属病院で分離された EPKp 119 株に関して、その約半数が ST307 であることを明らかにした。ST307 は新規の多剤耐性ハイリスククローンとして世界で注目されているクローンだが、日本からの報告例はまだ少なく、日本での大規模な拡散を示した既報はない。本研究で分離した 60 株の ST307 は全ての株が CTX-M-15 を保有していたが、ST307 は CTX-M-15 の保有と密接に関係するクローンとして知られており、既報通りの特徴を有していた。ST307 60 株のうち接合伝達を確認できたのは 54 株で、その 54 株すべてにおいて IncFII<sub>k</sub> が大腸菌 J53 へ接合伝達した。すなわち、ST307 が保有する CTX-M-15 は Inc FII<sub>k</sub> プラスミド上にコードされており、他の菌種へ高率に伝播することが示唆された。本研究で分離された ST307 は非 ST307 と比較して薬剤耐性傾向が強いことが示された。特にレボフロキサシンに対する耐性率の高さが顕著であった。既報では quinolone resistance determinant regions の gyrA、parC の変異や、プラスミド性のキノロン耐性を獲得した ST307 の報告が散見され、これらの遺伝子変異やプラスミド獲得によるものであろうと推測された。今後は、これら薬剤耐性機序の詳細な解明に加えて、その他の耐性遺伝子や病原性遺伝子の保有状況について解析を行うとともに、周辺の医療機関や全国の医療機関から広く菌体を収集し、多施設での分離状況についてさらなる検討を行う予定である。