

19980489

平成10年度
厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

細菌の薬剤耐性機構の分子解析 と耐性機序別迅速検出法 に関する研究

研究報告書

主任研究者 藤原 博

平成10年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

細菌の薬剤耐性機構の分子解析と耐性機序別迅速検出法に関する研究班 班員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	藤原 博	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	室 長
分担研究者	荒川 宜親	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	部 長
	渡辺 治雄	国立感染症研究所 細菌部	部 長
	池 康嘉	群馬大学医学部 微生物学教室 同 薬剤耐性菌実験施設	教 授 施設長
	堀田 國元	国立感染症研究所 生物活性物質部	室 長
	渡邊 邦友	岐阜大学医学部 嫌気性菌実験施設	教 授
	中江 太治	東海大学医学部 分子生命化学教室	教 授
	中島 良徳	北海道薬科大学 微生物学	教 授
	井上 松久	北里大学医学部 微生物学	教 授
	澤井 哲夫 小原 康治	千葉大学薬学部 微生物薬品化学教室 同	教 授 助教授
	山口 恵三	東邦大学医学部 微生物学教室	教 授
研究協力者	八木 哲也	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	
	柴田 尚宏	同 上	
	黒川 博史	同 上	
	柴山 恵吾	同 上	
	蒲池 一成	同 上	
	和田 昭仁	国立感染症研究所 細菌部	
	谷本 弘一	群馬大学医学部 微生物学教室	
	小澤 良之	同 上	
	藤本 修平	同 上	
	野村 隆浩	同 上	
	富田 治芳	同 上	
	石川 淳	国立感染症研究所 生物活性物質部	
	吉良 清子	同 上	
	近藤 信一	(財)微生物化学研究所	
	加藤 直樹	岐阜大学嫌気性菌実験施設	
	山添 喜久雄	同 上	
	中野 厚子	東海大学医学部分子生命科学	
	松岡 眞由美	北海道薬科大学 微生物学教室	
	小林 弘幸	同 上	
	岡本 了一	北里大学医学部 微生物教室	
馬 リン	東邦大学医学部 微生物教室		
大野 章	同 上		
石井 良和	同 上		

分担研究課題 及び 目 次

総括研究報告書-----	1
藤原 博	
分担研究報告書	
荒川 宜親 第三世代セフェム薬耐性菌の遺伝子解析と メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の簡易識別法の確立-----	5
池 康嘉 Vancomycin 耐性腸球菌 <i>E. faecalis</i> CB26 (Vancomycin 高度耐性 Teicoplanin 低感受性) のVancomycin 耐性遺伝子 (Van) の分子遺伝学的研究-----	7
井上 松久 β-ラクタマーゼの分別検出法に関する研究-----	11
澤井 哲夫 病原細菌の生産するβ-ラクタマーゼのクラス鑑識法の考案-----	15
中江 太治 薬剤排出ポンプ発現による多剤耐性株の迅速検出法の開発-----	19
中島 良徳 マクロライド耐性機序と耐性菌の迅速検出法-----	23
堀田 國元 アミノグリコシド耐性菌の耐性機構の解析と迅速検出法に関する研究-----	27
山口 恵三 喀痰中β-ラクタマーゼ活性の測定方法の確立に関する検討-----	32
渡邊 邦友 嫌気性菌におけるカルバペネム耐性菌の迅速検出法の確立-----	37
渡辺 治雄 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性に影響を与える因子の 染色マッピング-----	40

特許申請書-----	44

I. 総括研究報告書

細菌の薬剤耐性の分子解析と耐性機序別迅速検出法に関する研究

主任研究者 藤原 博 （国立感染症 細菌・血液製剤部）

研究要旨

本研究では、臨床分離される各種の薬剤耐性菌の耐性機構の分子解析とその研究成果を応用し、迅速検出法の確立を試みている。新しい薬剤耐性菌の耐性機構の分子解析の主な成果として以下を挙げる事ができる。①SHV-5a型ESBLを産生するセフトジジム（CAZ）耐性*K. pneumoniae*の存在を国内ではじめて確認した。②マクロライド不活化遺伝子*mphBM*を保有する臨床分離黄色ブドウ球菌が世界ではじめて確認された。③黄色ブドウ球菌においてテイコブラニンの耐性に関与する遺伝子の染色体上の大まかな位置を確認した。また、新しい検査法の開発として、以下の成果が挙げられた。①IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を簡便に識別する方法の確立。②β-lactamaseを喀痰から直接、迅速に抽出し酵素学的な解析を行う方法の開発。③アルベカシン耐性MRSAから*mecA*と*aac(6)/aph(2'')*の両遺伝子を同時に検出する方法の開発。④PCaseTESTの改良により、大腸菌の産生する酵素のクラスを30分以内に迅速に同定する方法の開発。⑤抗OprM抗体を用いたウエスタンブロット法によりMexA,B-OprM排出ポンプの高発現多剤交叉耐性株を検出する方法の開発。特に①のIMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を簡便に識別する方法については、特許申請を行い、実際に臨床検査の現場での実用化を目指してキット化を検討している。

A. 研究目的

国際的に見た場合、我が国は1970年代から各種の細菌に強力な抗菌活性を示す様々な抗菌薬の開発の先頭に立ってきた。そしてこれらの新しい抗菌薬が臨床で用いられ、細菌感染症の治療は大きく進歩した。しかし、1980年代に入るとMRSAをはじめ種々の薬剤耐性菌による院内感染症や術後感染症が問題となり、現在、薬剤耐性菌による感染症は臨床的に大きな脅威として浮上しつつある。特に、我が国では、欧米で未だ一般的ではない多数の「新薬」が認可されており、また、それらは比較的自由に用いることができるため、欧米では未だ出現していないような新手の薬剤耐性菌が出現しつつある。これらの薬剤耐性菌による院内感染症や術後感染症に対し適切な対策を講じるためには、臨床材料等から迅速にこれらの耐性菌を検出したり識別する事が不可欠となっている。本研究では、新しい耐性菌における薬剤耐性機構の分子解析を通じて、臨床的に問題となる種々の薬剤耐性菌を迅速かつ簡便に検出する方法の確立をを目指している。

B. 研究方法

1. 国内分離菌からのESBL遺伝子の検出

1996年7月に、関東地区の一医療施設で分離された、CAZ耐性*K. pneumoniae* HKY402株を選び、定法に従い、DNAを抽出し、制限酵素(*Bam*HI)処理をしたのち、同じ酵素で処理した、プラスミドベクター

pMK16に組み込み、*E. coli* HB101を形質転換し、CAZ耐性コロニーを選択した。

コロニーを培養し、組み替え体プラスミドに組み込まれた約3.5 kbのDNA断片の塩基配列の決定を行った。

2. メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の識別法の確立

メタロ-β-ラクタマーゼを産生する*P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*を用い、CAZを含む感受性試験用の試験ディスクとメタロ-β-ラクタマーゼの特異的阻害剤を含むろ紙片を組み合わせ、通常のNCCLSの方式を用いることで、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を簡便にかつ特異的に識別する方法を検討した。阻害剤としては、各種の重金属塩（CuCl₂など）やEDTAなどの金属キレート剤、また、各種のメルカプト化合物や含硫化合物を用いた。具体的には、NCCLSの感受性試験法に基づき、被菌液をMH寒天培地に綿棒で塗布し、その上にCAZの感受性試験用ディスク2個を4 cm離して置く。一方のCAZのディスクから2 cm程離して直径数mmのろ紙片を置き、これに阻害剤を加え、一夜、37℃で静置培養し阻止円の形状の変化から、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌か否かを判定する。

3. 黄色ブドウ球菌のテイコブラニン耐性遺伝子

大腸菌のFプラスミド複製開始点と枯草菌のpAM α1複製開始点を持つシャトルベクターpAW13を用い、テイコブラニン(TEIC)感受性実験室株BB255

(MIC, 1.5 mg/L)の染色体ライブラリーを作成した。コノライブラリーDNAを別の実験室株RN4220に導入した後、phage80 α を用いて、TEIC耐性株BB938に再度導入し、得られた72の形質導入株のTEICに対する感受性をしらべた。

4. 臨床分離黄色ブドウ球菌のマクロライド耐性

臨床分離黄色ブドウ球菌よりマクロライド不活化遺伝子*mphBM*を世界に先がけ見出した。そこで、臨床分離黄色ブドウ球菌における本遺伝子の保有状況をPCR/サザンハイブリダイゼーション法により調査した。一方、マクロライド耐性黄色ブドウ球菌の90%以上は*erm*遺伝子を保有していることから、起因菌の分離培養を行うことなく、耳腔及び鼻腔拭い液からの*erm*遺伝子のPCR法による直接高感度検出法の検討を行った。

5. 喀痰材料からの β -ラクタマーゼの直接的検出

喀痰にリン酸緩衝液を添加してホモジネート後、超遠心して喀痰中 β -lactamaseを抽出した。

β -lactamase活性は基質としてニトロセフィンを用いてUV法で測定した。すなわち、自記吸光度計を用いて1分間酵素液とその基質液を反応させてその間の吸光度の変化を計測した。得られた吸光度の変化をグラフにミカエリス・メンテンのプロットを行い、酵素学的パラメータを算出した。

6. PCCaseTESTの改良による β -ラクタマーゼのクラス分類

何らかの β -ラクタマーゼを産生する臨床分離大腸菌(87株)のABPC, ABPC/CVA, PIPC, PIPC/CVA, CET, CTM, CAZ, CTX, AZT, CFPM, CMZ, CPDX, IPMなどに対する薬剤感受性を測定した。更に全株から粗酵素液を抽出してUV法により酵素のクラス分類を行った。これらの菌株について改良型PCCaseTESTを用いた迅速診断の結果と薬剤感受性結果から産生酵素の同定を試み、UV法による同定結果と比較してその特異性を検討した。

7. 抗OprM抗体による薬剤汲み出し型耐性菌の検出

寒天固形培地上に成育した菌を、A6001cm=0.15の間になるよう50mMリン酸緩衝液pH7.0に浮遊した。この菌浮遊液を2倍希釈により連続的に希釈し、これを0.1%のSPSを含む緩衝液中で100℃1分加熱した後、その各々の100 μ lを吸引によりメンブレン上に吸着させた。この膜を先に調成しておいた抗OprM抗体で75分間処理した後2次抗体を30分作用させ、30分間発色反応を行った。

8. アルベカシン耐性MRSAの耐性遺伝子の検出

アルベカシン(ABK)耐性MRSAの2種の耐性遺伝

子[メチシリン耐性遺伝子*mecA*とABK耐性遺伝子*aac(6)/aph(2)*]を一度のPCRによって検出するための条件を検討・確立した。その方法を用いて、全国コレクションのABK耐性臨床分離株(MRSA33株と未同定株10株)を対象に両遺伝子の存否を検索し、ABK耐性および菌学的性状との相関性を調べた。

9. *Bacteroides fragilis*の*cafA*耐性遺伝子の解析

*B. fragilis*臨床分離株を用い、MICは米国のNCCLSの方法に従い寒天平板希釈法で測定した。メタロベータラクタメースはUV法とバイオアッセイで検出した。*cfiA*の直上流にあるinsertion element (IS)の塩基配列決定は*cfiA*を有し、メタロベータラクタメース産生株について行った。ISはPodglajenらが報告したISの直上流の塩基配列から選んだforward primer Gと*cfiA*の5'末端近傍を含むreverse primer Eを用いてPCRで増幅して得た。

10. VREの*van*遺伝子クラスターの解析

臨床分離されたVREと鶏肉などから分離されたVREの遺伝学的関連を解析するため、この領域に存在する各遺伝子の配列を決定し、既に報告されているVCM耐性トランスポゾンTn1546のそれと比較検討を行った。

11. 病原細菌の産生する β -ラクタマーゼのクラス鑑別法

臨床分離される細菌が、どのクラスの β -ラクタマーゼを産生しているかを、 β -ラクタマーゼ阻害作用を示す物質(クラブラン酸、Syn2161、J110,441)を用いて識別する方法を検討した。MIC測定は、一般的な微量液体希釈法の他に、ルシフェラーゼ発光法(ATP法)を改良したMIC迅速測定法を試みた。

C. 研究結果

1. 国内分離菌からのESBL遺伝子の検出

CAZ耐性*K. pneumoniae* HKY402株(表1、図1)からクローニングした β -ラクタマーゼの遺伝子の周辺の塩基配列を決定した結果、遺伝子の配置は図2に示す如くであった。また、遺伝子から推定されるアミノ酸配列をデータベースと照合したところ、欧米で報告されている、SHV-5a型ESBLと一致した(図3)。

2. メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の識別法の確立

メタロ- β -ラクタマーゼを阻害する様々な物質について検討した結果、メルカプトプロピオン酸、あるいはメルカプト酢酸を用いた場合、最も良い結果が得られることが判明した。試験結果の例を、図4に示す。

この方法を用いることにより、PCR法などの方法を用いることなく、メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌をESBL産生菌やAmpC産生菌と識別することが可能となった。

3. 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性遺伝子

TEIC感受性株TPS42とTPS62(ともにMIC, 3 mg/L)の染色体を、パルスフィールドゲル電気泳動で解析したところ、TPS42ではTEIC感受性株由来の*SmaI*-Dと*SmaI*-L DNA断片の一部が、TPS62ではTEIC感受性株由来の*SmaI*-Iの一部が、BB938に導入され、この株をTEICに対して感受性に行っていることがわかった。この結果、黄色ブドウ球菌のTEIC耐性に影響を与える遺伝子が、これらの断片上に存在し、感受性有意に働いていると考えられる。

4. 臨床分離黄色ブドウ球菌のマクロライド耐性

PCR法による*mphBM*遺伝子の検出で、臨床分離マクロライド耐性黄色ブドウ球菌177株中、11株に増幅産物が得られた。しかし、当該産物に*mphBM*をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ全て陰性であり、*mphBM*保有マクロライド耐性黄色ブドウ球菌は蔓延していないことが示唆された。

一方、臨床検体からの*erm*遺伝子直接検出は、耳腔拭い液では直接熱抽出で、鼻腔拭い液ではジチオスレイトール処理後熱抽出法により $10 \times E2$ オーダーの菌量で検出が可能であった。

5. 喀痰材料からの β -ラクタマーゼの直接的検出

喀痰から β -lactamaseを抽出するまでに要する時間は約30分であった。緑膿菌の場合は、喀痰中 $10 \times E5$ cfu/ml程度の菌量が存在すれば β -lactamaseの活性を検出することができた。一方、 β -lactamase非産生菌の場合、 $10 \times E6$ cfu/mlの菌量が喀痰中に存在しても吸光度に変化が認められなかった。得られた吸光度変化から酵素学的パラメータを算出したところ、その酵素がどのような β -lactamaseなのか推定することが可能であった。

6. PCaESTESTの改良による β -ラクタマーゼのクラス分類

産生酵素の種類についてUV法を用いて同定を行ったところ、Class A β -ラクタマーゼ (ESBLsを除く) 産生菌22株、Class A β -ラクタマーゼ (ESBLs) 産生菌21株、Class C β -ラクタマーゼ産生菌37株、Class A+Class C産生菌6株、ESBL+ Class C産生菌1株であった。これらの株についてCFPMのMIC (ブレイクポイント $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) と改良型PCaESTESTの結果を用いると全体で99%の株について産生酵素クラスの同定が可能であった。

7. 抗OprM抗体による薬剤汲み出し型耐性菌の検出

L-agar培地上に生育した野性株のコロニーをかき取

りそれから菌の浮遊液A600=0.15程度を調製し、これの $100 \mu\text{l}$ をメンブレン上に吸着させたとき陽性反応が得られた。

MexA,B-OprMの発現が亢進していることが明らかとなっている株では共に上記濃度の菌液を8倍希釈をした時に親株と同程度の陽性度を示した。これらの変異菌のOFLX、CP及びCPRに対するMICは各々に野生株の8、8、4倍程度であるのでMICとOprMの発現の相関は非常に高かった。

8. アルベカシン耐性MRSAの耐性遺伝子の検出

MRSA株ではいずれも*mec*遺伝子が検出されたが、ABK耐性遺伝子に関しては23株しか検出されなかった。未同定株では10株いずれにも*mec*遺伝子は検出されず、5株においてABK耐性遺伝子が検出された。一方、抗生物質耐性試験の結果、MRSAではアルベカシン耐性とABK耐性遺伝子との間に相関性が認められた。未同定株では、ABK耐性と*aac(6)/aph(2)*遺伝子の間に相関性がなく、菌学的性状試験によって菌株はすべて腸球菌と判定された。

9. *Bacteroides fragilis*の*cafA*耐性遺伝子の解析

イミペネム耐性遺伝子である*cfIA*の直上流にあるISをprimer GとEを用いたPCRで検出したところ、*cfIA*陽性のすべてのイミペネム耐性株で、約2-kbpのPCR産物が得られた。PCR産物の塩基配列決定により、5菌株から5種類のIS-like elementが検出されたが、2種類は99.6%の類似性を示したことから、同じ遺伝子であると思われた。決定された塩基配列からプライマーを選び、PCRを行った所、2種類のIS-like elementが特異的に検出された。

10. VREの*van*遺伝子クラスターの解析

鶏肉由来のVRE(CB26株)とヒト由来臨床分離株(FN1)の*van*遺伝子領域は、Tn1546と同様に7個の遺伝子で構成されていた。各々の*van*遺伝子をTn1546のそれらと比較した場合、CB26においては*vanH, A, X, Y, Z*の5つの遺伝子が、FN1においては*vanH, A, X, Z*の4つの遺伝子がTn1546の遺伝子と同一の塩基配列を示すことが明らかとなった。

11. 病原細菌の産生する β -ラクタマーゼのクラス鑑別法

クラス及び酵素的性質の明らかな7菌種14株の β -ラクタマーゼ産生菌を対象に、阻害剤を用いた試験を行った。その結果、クラスAに属する β -ラクタマーゼは、CVAによってのみ阻害を受け、クラスCに属する β -ラクタマーゼは、CVAとSyn2161によって阻害を受けた。また、クラスBに属するメタロ- β -

ラクタマーゼは、CVAとSyn2161によって阻害を受けず、J110,441によってのみ阻害を受けた。しかし、クラスDに属するOXA型 β -ラクタマーゼは、Syn2161とJ110,441によって阻害を受けず、CVAによってのみ阻害を受け、クラスAに属する β -ラクタマーゼと識別が困難であった。拡張型のクラスC β -ラクタマーゼは、CVAによってのみ弱く阻害を受けるという特徴が見られた。この結果、これらの薬剤を用いることにより β -ラクタマーゼのクラスを推定することが概ね可能であった。しかし、特異性を高めるためには、さらに改良を試みる必要がある。

ルシフェラーゼ発光法により、MIC値の判定時間を5分の1以下(3時間30分)に短縮することが可能であった。

D. 考 察

本研究班は、平成9年度から平成11年度の3年計画で、研究を進めているが、既に、SHV-5a型ESBLを産生するCAZ耐性*K. pneumoniae*の存在を国内ではじめて確認し、さらに、マクロライド不活化遺伝子*mphBM*を保有する臨床分離黄色ブドウ球菌が世界ではじめて確認されるなどの成果が挙げられている。一方、臨床で問題となりつつあるIMP-1型メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌を、PCR法などの高価な検査法を用いることなく簡便に識別する方法を確立し、検査室で実施可能なPCRにかわる確認試験法として、キット化が検討されている。

その他にも、実用化が期待できる新しい迅速検出法の研究も複数進行中であり、平成11年度末までには、さらなる研究成果が期待されている。

細菌全般において多剤耐性菌や高度耐性菌などが増えており、細菌感染症を治療する上で脅威となりつつある。現在の検査体制では、臨床分離される細菌がどのような耐性傾向を獲得しているかを判別するのに、少なくとも1両日を要し、結果が得られた頃には患者が急変し手遅れとなっている場合も有る。また、VREなどを保菌する新規受け入れ患者の発見が遅れた場合、同室者等への二次感染や院内環境の広範な汚染が引き起こされる危険性がある。このような事態を防ぐためには、患者の臨床材料中にどのような薬剤耐性菌が存在するかを、短時間に検出・識別する検査法の確立が必要となっており、国民の健康的医療環境を保障する上でも、本研究班のような研究班を厚生科学研究として維持することは重要と考えられる。

平成12年度からの「薬剤耐性菌感染症サーベイランス」の事業化を目指して「薬剤耐性菌による感染症のサーベイランスシステムの構築に関する研究」班(主任研究者 荒川 宜親)「薬剤耐性菌感染症症例情報ネットワーク構築に関する研究」班(主任研究者 岡部 信彦)が共同で研究を進めている。この「薬剤耐性菌感染症サーベイランス」システムを運営する上で、患者がどのような薬剤耐性菌を保菌しているか、あるいは感染症の起因为菌がどのような薬剤耐性を獲得しているかを正確に判別する必要があり、本研究班の研究成果が期待される。

これまでに多くの薬剤耐性菌の耐性機構が解析されている。しかし、新たな抗菌薬の使用により、やがて新しい耐性菌が出現し臨床現場で広がるという現象は今後も続くと考えられる。我が国では、新規に開発された抗菌薬が臨床に導入されやすく、しかもそれらが第1選択薬的に用いられてきたため、メタロ- β -ラクタマーゼ産生緑膿菌のような、欧米では広がっていないような耐性菌が出現しつつある。一方、VREやESBL産生肺炎桿菌のように欧米では広がっているにもかかわらず国内では稀な耐性菌も少ない。したがって、我が国で分離される特異な耐性傾向を示す新たな薬剤耐性菌の解析は、我々自身の手で行う必要がある、本研究班のような研究グループを維持する必要がある。

E. 特許出願等

発明の名称：メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の判別方法

発明者：荒川宜親、後藤正文

特許出願番号：特願平11-26897号

F. 研究発表等

1. 黒川博史他、CAZ高度耐性の*K. pneumoniae*から分離されたSHV-型ESBLの遺伝子解析、第47回日本感染症学会東日本地方総会/第45回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会、東京、11月26-27日、1998。
2. 黒川博史他、本邦で分離されたSHV-型ESBLを産生する腸内細菌、第72回日本細菌学会総会、東京、3月24-26日、1999。

II. 分担研究報告書

第三世代セフェム薬耐性菌の遺伝子解析と メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の簡易識別法の確立

主任研究者 藤原 博 (国立感染症 細菌・血液製剤部)
分担研究者 荒川 宜親 (同 上)
研究協力者 黒川 博史、八木 哲也、柴田尚宏 (同 上)
研究協力者 後藤 正文 (熊本大学薬学部 薬品物理化学)

研究要旨

我が国で臨床分離された肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)の中から、第三世代セフェム薬であるセフトジジム(CAZ)に高度耐性(MIC, >128 μg/ml)を示す株を選び、そのCAZ耐性に関与する遺伝子を解析した。その結果、欧米で問題となっている基質拡張型β-ラクタマーゼ(Extended-spectrum β-lactamase: 略してESBL)の一つであるSHV-9(報告された当初の名称はSHV-5a)の遺伝子と同等の遺伝子をこの菌は保有していることが確認された。この菌の保有する遺伝子は伝達性のプラスミドにより媒介されており、それを、既に発表されているSHV-5aの遺伝子と比較した場合、構造遺伝子内に3箇所の変異が確認されたが、アミノ酸配列の変化を伴わないサイレント変異であった。

欧米では、TEM-由来またはSHV-由来のESBL産生菌による日和見感染や院内感染が問題となっているが、国内ではこれまで、この種のESBLは確認されていなかった。今回の調査研究により、我が国にも既にSHV-9型ESBLを産生するCAZ高度耐性*K. pneumoniae*が既に侵入している事がはじめて遺伝子レベルで確認された。今後、この種の耐性菌の動向に注意を払う必要がある。

また、臨床で使用可能な、ほぼ全てのβ-ラクタム薬を分解不活化するメタロ-β-ラクタマーゼを産生する菌を、検査室で簡便かつ特異的に識別する方法を確立した。

A. 研究目的

我が国では、各種のグラム陰性桿菌に広い抗菌活性を示す、セフトキシム(CTX)やセフトジジム(CAZ)などの第三世代セフェム薬が1980年代から細菌感染症の治療に用いられて来た。これらの抗菌薬は、現時点でも肺炎桿菌や大腸菌などに抗菌活性が期待できるものの、一部には耐性菌の出現が報告されている。それらの産生するβ-ラクタマーゼを解析した場合、多くはToho-1型のβ-ラクタマーゼやAmpC型セファロスポリナーゼ、あるいは、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼなどであり、欧米で広がっている、TEM-由来またはSHV-由来の拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)はこれまで確認されていなかった。しかし、国際的な人や物資の交流が益々盛んになる中で、欧米から我が国に、各種のESBL産生菌が侵入している可能性が疑われた。しかし、ESBL産生菌は、通常感受性試験法により、Toho-1型のβ-ラクタマーゼやAmpC型セファロスポリナーゼ産生菌と識別することは難しいため、我が国におけるESBL産生菌の実態はこれまではっきりしていなかった。そこで、我々の保有する保存株の中から、CAZに高度耐性を示し、しかもそのCAZ耐性がクラブラン酸によって阻害される事により、ESBL産生菌である事が強く疑われた*K. pneumoniae*を選び、遺伝子のクローニングや解析を行った。

一方、メタロ-β-ラクタマーゼを産生する緑膿菌やセラチアなどの臨床分離株は、臨床で使用可能

なほぼ全てのβ-ラクタム薬に耐性を獲得している場合が多く、これらを日常の検査業務の中で簡便に識別する方法の確立が求められている。本研究ではメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を特異的かつ簡便に識別する方法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 国内分離菌からのESBL遺伝子の検出

1997年に、関東地区の一医療施設で分離された、CAZ耐性*K. pneumoniae* HKY402株を選び、定法に従い、DNAを抽出し、制限酵素(*Bam*HI)処理をしたのち、同じ酵素で処理した、プラスミドベクターpMK16に組み込み、*E. coli* HB101を形質転換し、CAZ耐性コロニーを選択した。

コロニーを培養し、組み替え体プラスミドに組み込まれた約3.5 kbのDNA断片の塩基配列の決定を行った。

2. メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の識別法の確立

メタロ-β-ラクタマーゼを産生する*P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*を用い、CAZを含む感受性試験用の試験ディスクとメタロ-β-ラクタマーゼの特異的阻害剤を含むろ紙片を組み合わせ、通常のNCCLSの方式を用いることで、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を簡便にかつ特異的に識別する方法を検討した。阻害剤としては、各種の重金属塩(CuCl₂など)やEDTAなどの金属キレート剤、また、各種のメルカプト化合物や含硫化合物を用いた。具体的には、NCCLSの感受性試験法に基づき、被菌液を

MH寒天培地に綿棒で塗布し、その上にCAZの感受性試験用ディスク2個を4 cm離して置く。一方のCAZのディスクから2 cm程離して直径数mmのろ紙片を置き、これに阻害剤を加え、一夜、37℃で静置培養し阻止円の形状の変化から、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌か否かを判定する。

C. 研究結果

1. 国内分離菌からのESBL遺伝子の検出

CAZ耐性*K. pneumoniae* HKY402株(表1、図1)からクローニングしたβ-ラクタマーゼの遺伝子の周辺の塩基配列を決定した結果、遺伝子の配置は図2に示す如くであった。また、遺伝子から推定されるアミノ酸配列をデータベースと照合したところ、欧米で報告されている、SHV-5a型ESBLと一致した(図3)。

2. メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の識別法の確立

メタロ-β-ラクタマーゼを阻害する様々な物質について検討した結果、メルカプトプロピオン酸、あるいはメルカプト酢酸を用いた場合、最も良い結果が得られることが判明した。試験結果の例を、図4に示す。

この方法を用いることにより、PCR法などの方法を用いることなく、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌をESBL産生菌やAmpC産生菌と識別することが可能となった。

D. 考察

今回、国内の臨床分離菌の中にSHV-5a型ESBLを産生する*K. pneumoniae*が存在することが、はじめて確認された。これまで、国内で検出されるCTX耐性*E. coli*などは、全てToho-1型β-ラクタマーゼ産生菌であり、これらをESBL産生菌としている報告も多いが、欧米で多数報告されている、TEM-、SHV-由来ESBLは、これまで確認されていなかった。今回の調査により、少なくともSHV-由来ESBL産生菌が国内に存在していることが確認されたことにより、この種の新たな耐性菌の存在を念頭に置いた、薬剤感受性試験とその判定を行うことが必要となっている。しかし、NCCLSの推奨する基準に従った場合、欧米と比べ、我が国では第三世代セフェム薬に耐性を獲得した臨床分離菌の割合が高くなっているなどの状況もあるため、ESBL以外のクラスA型β-ラクタマーゼ産生菌や、AmpC型β-ラクタマーゼの過剰産生株などがESBL産生菌として誤判定される可能性が高い。従って、我が国における独自の判定基準や検出法の確立を急ぐ必要がある。

メタロ-β-ラクタマーゼを産生する緑膿菌やセラチアなどが国内の各地から分離されている。これらの菌は、ほぼ全てのβ-ラクタム薬に耐性を示す傾向があり、将来、臨床上大きな脅威となると考えられている。

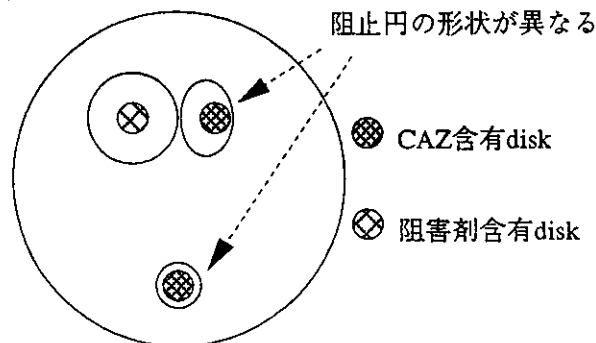
メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を識別するには、日常的な薬剤感受性試験法のみでは難しく、確定のためにはPCR法など遺伝子の検出による他は無かったが、PCR装置を必要とすることや検査費用等の面から検査室における日常的な検査業務の中で実施することはできなかった。今回確立した方法は、従来の薬剤感受性試験の方法を応用する事により、どのような細菌検査室でも基本的には実施可能であり、しかも安価であることからスクリーニング試験として用いることも可能である。また、特異性も高いため、PCR法に変代わる確認試験法としても有用性が高いと考えられる。

この検査法は、特許申請を行い、キット化を検討している(図5、6)。

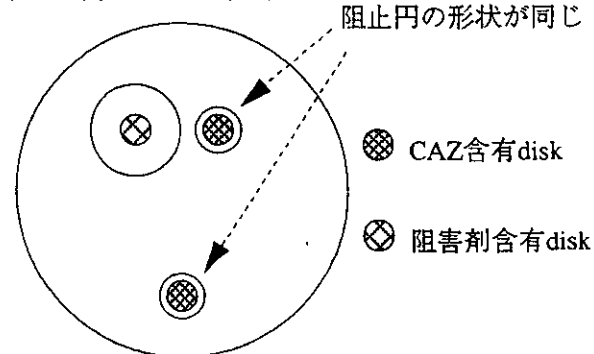
(特許出願番号：特願平11-26897号、識別番号：599016408)

阻害剤を用いた識別法の解説

★メタロ-β-ラクタマーゼを産生する 第三世代セフェム耐性菌



★メタロ-β-ラクタマーゼを産生しない 第三世代セフェム耐性菌



CAZを含有するdiskと阻害剤を含有するdiskを組み合わせることにより、発育阻止円(帯)の形状の比較からメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を簡便に識別することが可能である。

Vancomycin 耐性腸球菌 *E. faecalis* CB26 (vancomycin 高度耐性 teicoplanin 低感受性) の Vancomycin 耐性遺伝子 (*van*) の分子遺伝学的研究

分担研究者 池 康嘉

研究協力者 谷本弘一、橋本由利子、小澤良之、野村隆浩
(群馬大学医学部微生物学教室)

研究要旨

E. faecalis CB26は、日本の鶏舎糞便分離菌で vancomycin 高度耐性(MIC, 512 μ g/ml)、teicoplanin 低感受性(MIC, 4 μ g/ml)である。CB26の plasmid DNAが *vanA* probeと相補結合することからCB26の vancomycin耐性遺伝子(*van*)はプラスミド上に存在し VanA型である。CB26の plasmid DNA上の *van*遺伝子の塩基配列の解析からCB26の *van*遺伝子は野生型 VanA型遺伝子である Tn1546の VanA型遺伝子に含まれる *vanSR*, *vanHAX*, *vanYZ*のすべてを含んでいた。CB26と Tn1546の *van*遺伝子の塩基配列は glycopeptideの sensor蛋白の遺伝子である *vanS*以外はすべて同一であった。そして *vanS*遺伝子の1152塩基のうち148、160、207番目の3つの塩基が異なっていた。CB26を vancomycinと teicoplanin両薬剤を含む寒天平板で薬剤耐性検査を行った時、vancomycinの濃度に比例して teicoplanin耐性が高くなった。

A. 目的

临床上問題となる vancomycin 耐性腸球菌 (VRE) は VanA型 VREでその野生型又は prototype は vancomycin-teicoplanin 高度耐性である。

E. faecalis CB26は日本の鶏舎糞便分離の VREで vancomycin 高度耐性 teicoplanin 低感受性である。今回の研究では *E. faecalis* CB26の vancomycin 耐性遺伝子の構造解析を行い、野生型の VanA VREである Tn1546の VanA遺伝子との比較を行い、さらに vancomycin 高度耐性、teicoplanin 低感受性の遺伝学的解析を行った結果を報告する。

B. 材料と方法

用いた菌株。VREは日本の鶏舎糞便由来 VRE *E. faecalis* CB26である。

用いた培地。菌の生育には Todd Hewitt broth (Difco)を用いた。薬剤耐性検査、Muller Hinton

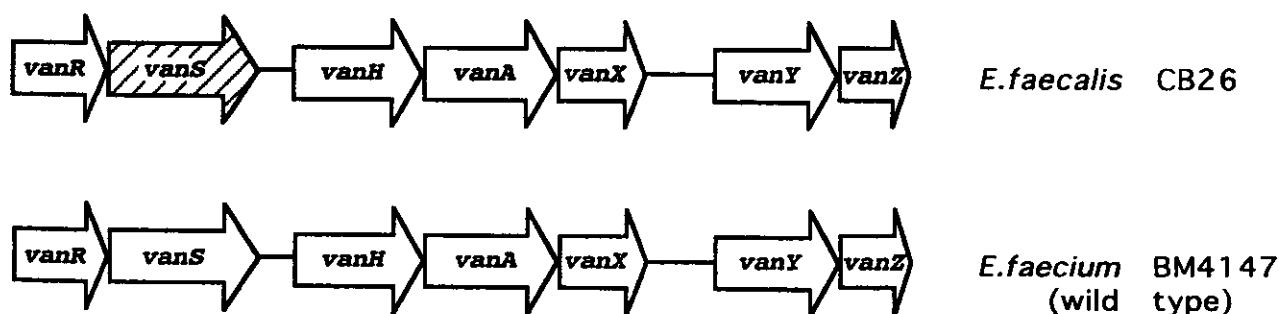
medium (Difco)を用いて薬剤寒天平板を作製した。方法は NCCLS法に従った。

Plasmid DNAの分離。アルカリ溶解法に従った。Southern Hybridization, Pulsed field gel electrophoresis, PCR法、塩基配列の決定等は前報に従った。

C. 結果

野生型又は prototype VanA型 vancomycin 耐性腸球菌 (VanA VRE) は vancomycin-teicoplanin 高度耐性である。最もよく解析されている野生型 VanA VREである *E. faecium* BM4147のプラスミド pIP816 (34kb)にふくまれる transposon Tn1546 (10.851kb)に存在する vancomycin 耐性遺伝子(*van*)は *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*の遺伝子からなるオペロン (複合遺伝子) である。この中で *vanRS*は調節遺伝子、*vanHAX*はバンコマイシン耐性構造遺伝子、*vanYZ*はバンコマイシン耐性付帯遺伝子

図1 *E. faecalis* CB26, *E. faecium* BM4147(pIP816::Tn1546)の Van遺伝子構造



☒2 Mutations in *vanS* gene of *E. faecalis* CB26

ttggtataaaattgaaaaataaaaaaacgactattccaaactagaacgaaactttac 60
 L V I K L K N K K N D Y S K L E R K L Y

atgtatacgttgcaattggtgtagcaattgtattcgtgtgtatattcgttcaatg 120
 M Y I V A I V V V A I V F V L Y I R S M

atccgagggaaacttggggattggatc^gtaagtattttg^caaaacaatatgacttaaat 180
 I R G K L G D W I L S I L E N K Y D L N
 (V) (Q)

cacctggacgcgatgaaattatatca^tattccatacgaacaatatagatatctttatt 240
 H L D A M K L Y Q Y S I R N N I D I F I
 (H)

tatgtg^ccgattgtcattagattcttattctatg^cgcgctatgctttcaaaattcgca 300
 Y V A I V I S I L I L C R V M L S K F A

aaatactttgacgagataaataccggcattgatgtacttattcagaacgaagataaaca 360
 K Y F D E I N T G I D V L I Q N E D K Q

attgagctttctg^cgaaatggatgttatggaacaaagctcaacacattaaacggact 420
 I E L S A E M D V M E Q K L N T L K R T

ctg^cgaaagcgagagcaggatgcaaagctg^cccgaacaaagaaaaatgacgtt^cgttatg 480
 L E K R E Q D A K L A E Q R K N D V V M

tacttggcgacgatattaaacgccccttacatccattatcggtattttgac^cctgctt 540
 Y L A H D I K T P L T S I I G Y L S L L

gacgagctccagacatg^ccggtagatcaaaaggcaaagtatgtcatatcacgttggac 600
 D E A P D M P V D Q K A K Y V H I T L D

aaagcgtatcgactcgaacagctaatcgacgagtttttgagattacaggtataaccta 660
 K A Y R L E Q L I D E F F E I T R Y N L

caaacgataaacgtaacaaaaacgcacatagacctatactatagtctggtgcagatgacc 720
 Q T I T L T K T H I D L Y Y M L V Q M T

gatgaattttatcctcagctttccgcacatgga^caacaggcgttattcacgccccgag 780
 D E F Y P Q L S A H G K Q A V I H A P E

gatctgaccgtgtcggcgaccctgataaaactcgcgagagtc^ctttaacaacattttgaaa 840
 D L T V S G D P D K L A R V F N N I L K

aacgccgctgcatacagtgaggataaacgacatcattgacattaccg^cggcctctccggg 900
 N A A A Y S E D N S I I D I T A G L S G

gatgtggtgtcaatcgaattcaagaactggaagcatcccaaaagataagctagctgcc 960
 D V V S I E F K N T G S I P K D K L A A

atattgaaaagtctataggctggacaatgctcgttcttccgatacgggtggcgcggga 1020
 I F E K F Y R L D N A R S S D T G G A G

cttgattggcgattgcaaaagaattattgttcagcatggaggcagatttacg^cggaa 1080
 L G L A I A K E I I V Q H G G Q I Y A E

agcaatgataactatacgcgcttagggtagagcttccagcagatgccagacttggttgat 1140
 S N D N Y T T F R V E L P A M P D L V D

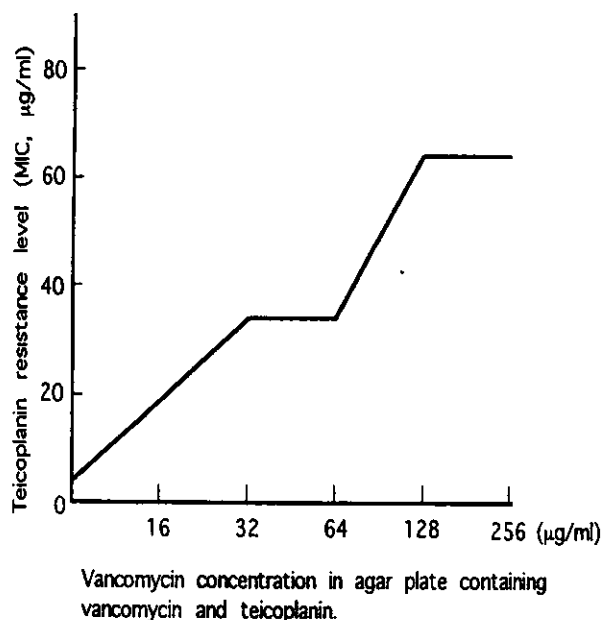
aaaaggaggtcctaa
 K R R S *

である(図1)。 *E. faecalis* CB26は日本の鶏舎糞便由来のVREでvancomycin (MIC 512 $\mu\text{g/ml}$)高度耐性teicoplanin (MIC 4 $\mu\text{g/ml}$)低感受性であった。CB26のDNAはvanA primerを用いたPCRによって特異的なPCR産物(0.732kb)が得られることと、プラスミドDNAがvanA probeと相補結合することからvanA型VREで、その遺伝子はプラスミド上に存在する。

CB26のVanA遺伝子の構造解析(塩基配列)を行った。その結果CB26のVanA遺伝子は、最も一般的な野生型VanA遺伝子であるTn1546のVanA遺伝子に含まれるすべての遺伝子vanSR、vanHAX、vanYZ(図1)を保持していた。それぞれの遺伝子の塩基配列はvanSの塩基配列以外はすべての遺伝子が、Tn1546の遺伝子と同一塩基配列を示した(図1)。CB26とTn1546のvanSは3ヶ所の塩基が異なっていた(図2)。

VanS蛋白は、glycopeptide (vancomycin, teicoplanin, avoparcin)を感知するsensor蛋白で、glycopeptideが存在する時、VanR蛋白をリン酸化し活性化させる。活性化されたVanR蛋白はvanHAXを発現させ、VanA耐性を発現する。*E. faecalis* CB26のteicoplanin低感受性が、VanA遺伝子のsensor遺伝子vanSの変異によりVanS蛋白がvancomycinには反応するが、teicoplaninには反応しないためであるか調べた。それぞれ濃度の異なるvancomycinとteico

図3 Teicoplanin Resistance Level of *E. faecalis* CB26 on Agar Plate Containing Vancomycin and Teicoplanin



planinの両薬剤を含む寒天平板で薬剤耐性検査を行った。その結果、vancomycinを含まない時はteicoplaninのMICは4 $\mu\text{g/ml}$ であるが、寒天平板に含まれるvancomycinの濃度が高くなるに従ってteicoplanin耐性値は高くなった(図3)。そして最も高い耐性値としてvancomycinの濃度が256 $\mu\text{g/ml}$ の時、teicoplanin濃度 64 $\mu\text{g/ml}$ を含む寒天培地に生育した。vancomycin 256 $\mu\text{g/ml}$ とteicoplanin 64 $\mu\text{g/ml}$ を含む寒天培地に生育したコロニーを薬剤を含まないTHB寒天培地で3回純粋培養を行った後のteicoplanin耐性値は*E. faecalis* CB24のteicoplaninのMIC値である4 $\mu\text{g/ml}$ を示した。これらの結果より*E. faecalis* CB24のglycopeptide耐性はvancomycinにより誘導されるがteicoplaninでは誘導されないことが解った。

D. 考察

野生型又はprototypeのVanA型VREはvancomycin及びteicoplanin高度耐性である。*E. faecalis* CB26はvancomycin高度耐性(MIC 512 $\mu\text{g/ml}$) teicoplanin (MIC 4 $\mu\text{g/ml}$)低感受性であるがvanA probeと相補結合をするvanA遺伝子を保持するVanA型VREであった。CB26のvanA遺伝子はプラスミド上に存在し、そのvancomycin耐性遺伝子はVanA型、野生型vancomycin耐性遺伝子のもつvanSR、vanHAX、vanYZのすべての遺伝子を保持していた。各遺伝子の塩基配列の比較の結果、vanSのみがCB26とTn1546の間で3塩基異なりその結果3つのアミノ酸が異なっていると推測される。他の遺伝子はすべて両者で同一であった。vancomycinとteicoplanin両薬剤を含む寒天培地でCB26の薬剤耐性検査を行うとvancomycinの濃度に比例してteicoplanin耐性が上昇する。これらの結果は、VanS蛋白はglycopeptideのsensor蛋白であるがVanS変異によりVanS蛋白はvancomycinは認識できるかteicoplaninは認識できなく低感受性となる。しかしながらvancomycinでVanA遺伝子が誘導されるとteicoplaninに耐性となることを示している。

E. 結論

1. 日本の鶏糞便より分離されたVRE、*E. faecalis* CB26はvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性でVanA型VREであった。
2. *E. faecalis* CB26のvancomycin耐性遺伝子はplasmid上に存在した。

3. *E. faecalis* CB26のvancomycin耐性遺伝子はVanA型の野生型耐性遺伝子のもつ*vanSR*、*vanHAX*、*vanYZ*遺伝子のすべてを保持していた。その塩基配列は*vanS*遺伝子のみが野生型と異なっていた。
4. *E. faecalis* CB26の*van S*遺伝子の塩基配列は野生型*van S*遺伝子の塩基配列の3ヶ所が変異していた。
5. *E. faecalis* CB26のteicoplanin低感受性はglycopeptideのsensor蛋白遺伝子*van S*の変異により*vanS*蛋白がteicoplaninを認識できないことによる。

F. 研究発表

1. 論文発表

H. Tomita, S. Fujimoto, K. Tanimoto, and Y. Ike: Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* 179:7843-7855, 1997

Y. Ozawa, K. Tanimoto, S. Fujimoto, H. Tomita, and Y. Ike: Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (*uvr*) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. *J. Bacteriol.* 179:7468-7475, 1997

N. Fujita, M. Yoshimura, T. Komori, K. Tanimoto, Y. Ike: Letters to the Editor.

First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2150, 1998

Y. Ike, K. Tanimoto, H. Tomita, K. Takeuchi, and S. Fujimoto: Efficient Transfer of the Pheromone-Independent *Enterococcus faecium* Plasmid pMG1 (Gm^I) (65.1 Kilobases) to *Enterococcus* Strains during Broth Mating. *J. Bacteriol.*, 180:4886-4892, 1998.

X. Ma, M. Kudo, A. Takahashi, K. Tanimoto, and Y. Ike: Evidence of nosocomial infection in Japan caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and identification of the pheromone-responsive conjugative plasmid encoding gentamicin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 36:2460-2464, 1998

A. Shiono and Y. Ike: Isolation of *Enterococcus faecalis* clinical isolates that efficiently adhere to human bladder carcinoma T24 cells and inhibition of adhesion by fibronectin and trypsin treatment.

Infection and Immunity 67:1585-1592, 1999

β-ラクタマーゼの分別検出法に関する研究

井上松久・岡本了一・久保田孝一 北里大学医学部微生物学

β-ラクタマーゼ産生大腸菌 87 株を用いて PCaseTEST による β-ラクタマーゼの迅速診断について検討した。市販されている PCaseTEST では Class C β-ラクタマーゼの多量産生菌では偽陽性反応が問題であったが、MCIPC を用いて改良を行った結果、改良型 PCaseTEST と CFPM の MIC を組み合わせることにより ESBLs、Class A、Class C β-ラクタマーゼを分別して検出することが可能となった。その同定率は全体で 99%であった。

A. 研究目的

細菌検査室で通常行われている β-ラクタマーゼ検査は、ブドウ球菌、腸球菌、インフルエンザ菌、ナイセリア菌、カタラーリス菌、バクテロイデス菌など限られた菌種の β-ラクタマーゼ産生性を知ることが目的としているため、酵素の種類を分別して検出することはできない。特に腸内細菌や緑膿菌では、染色体性に Class C β-ラクタマーゼを産生するため、たとえ典型的なプラスミド性の β-ラクタマーゼを産生してもそれらの区別は容易ではないためにほとんど行われない。しかし、最近では臨床から分離される腸内細菌や緑膿菌の中にはプラスミド性の Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBLs)、Class B β-ラクタマーゼ (カルバペネマーゼ)、Class C β-ラクタマーゼ (セファロスポリナーゼ)などを産生する広域 β-ラクタム薬耐性菌が出現してきており、迅速にこれら酵素の種類を分別検出することは適切な治療薬選択に重要な情報を与えることになる。細菌検査室で日常的に用いられる検査方法には、簡便性と迅速性が要求される。私共の研究室では、既にアシドメトリー法を応用した PCase TEST を用いて簡便にできる β-ラクタマーゼの分別検出法を開発しており、本研究では、腸内細菌からの ESBLs ならびに Class C β-ラクタマーゼの迅速検出における PCase TEST の有用性と問題点について検討した。

B. 研究方法

今回対象とした菌株は、何らかの β-ラクタマーゼを産生する臨床分離大腸菌 (87 株) に限定した。まず、β-ラクタマーゼ産生菌の ABPC, ABPC/CVA, PIPC, PIPC/CVA, CET, CTM, CAZ, CTX, AZT, CFPM, CMZ, CPDX, IPM などに対する薬剤感受性

を測定した。

β-ラクタマーゼの分類は、全株から粗酵素液を抽出して UV 法により酵素のクラス分類を行った。さらに、これらの菌株について PCase TEST を用いた迅速診断を行い、UV 法による同定結果と比較してその特異性を検討した。

C. 研究結果

(1) β-ラクタマーゼ産生大腸菌の薬剤感受性と産生酵素

β-ラクタマーゼ産生大腸菌の薬剤感受性は、概ね次の 3 つのグループに分類された。ABPC (>128 μg/ml)、PIPC (>64 μg/ml) 耐性であるが CVA (5 μg/ml) の添加で MIC が著しく低下し、第三世代セフェム系薬やセファマイシン系薬に感受性を示すグループ。ABPC (>128 μg/ml)、PIPC (>64 μg/ml) 耐性であるが CVA (5 μg/ml) の添加で MIC が著しく低下するが、CTX, CAZ, AZT, CPDX など第三世代セフェム系薬に耐性を示すグループ。

PIPC に 32-64 μg/ml の MIC を示すが、CVA の添加により MIC が低下しないグループ。これら菌株は CTX, CAZ, AZT には 1-2 μg/ml の MIC を示す。しかしながら、いずれのグループにも属さない菌株も一部存在した。

次にこれら菌株の産生酵素の種類について UV 法を用いて同定を行ったところ、Class A β-ラクタマーゼ (ESBLs を除く) 産生菌 22 株、Class A β-ラクタマーゼ (ESBLs) 産生菌 21 株、Class C β-ラクタマーゼ産生菌 37 株、Class A+Class C 産生菌 6 株、ESBL+ Class C 産生菌 1 株であった。そこで、産生酵素の種類と第三世代セフェム系薬 (CPDX) の MIC との関係を図 1 に示した。

NCCLS ガイドラインによると、CPDX, CAZ,

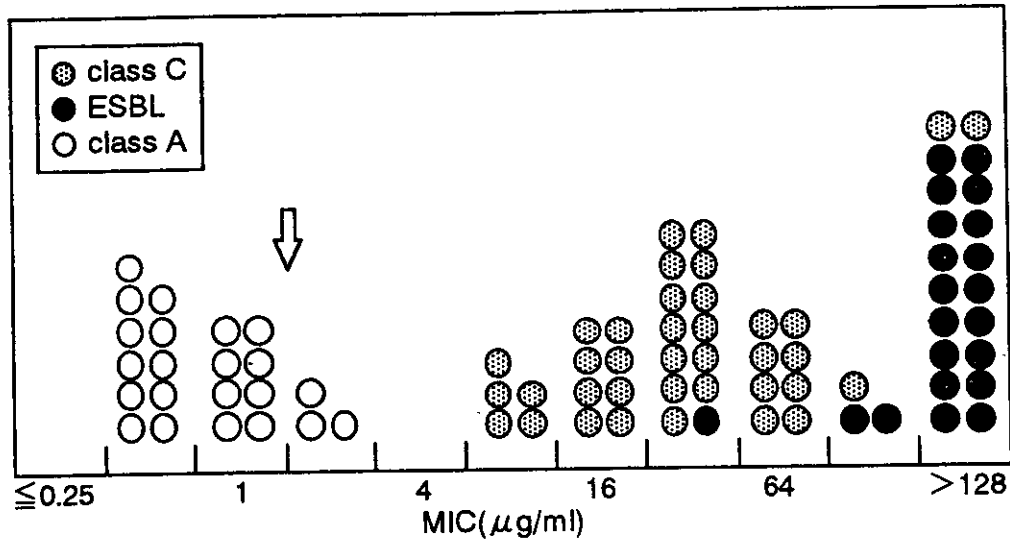


図1 β-ラクタマーゼ産生性とCPDXのMIC

CTX, AZT, CTRX のいずれかに MIC2 μg/ml 以上を示す大腸菌、肺炎桿菌は ESBL 産生を疑うとなっているが、大腸菌の場合にはこの範疇に ESBL 産生菌だけでなく、染色体性に Class C β-ラクタマーゼを多量に産生する菌株も含まれることがわかった。そこでこれらの酵素を分別の可能性を検討した。

(2) PCCaseTEST による β-ラクタマーゼの分別検出

PCCaseTEST に β-ラクタマーゼの検出結果を UV 法による同定結果と比較して表 1 に示した。その結果、PCCaseTEST により Class A β-ラクタマーゼ産生菌および ESBL 産生菌は共にペニシリナーゼ型酵素 (Class A β-ラクタマーゼ) として 100% 同定可能であった。しかし、Class C β-ラクタマーゼ産生菌

では 35/37 (94.5%) が Class C β-ラクタマーゼ/Class A β-ラクタマーゼの両酵素を産生しているように同定され、実際に 2 つの酵素を産生している菌株との区別が困難であった。これら 35 株は Class C β-ラクタマーゼの産生量が多いために偽陽性反応が起こっていることが明らかになった。

(3) PCCaseTEST の改良

Class C β-ラクタマーゼ多量産生菌による偽陽性反応は、多量の酵素によって検出基質であるベンジルペニシリン (PCG) が僅かに加水分解されることによっておこるためである。そこで偽陽性反応を抑制するために、Class C β-ラクタマーゼを特異的に阻害するクロキサシリン (MCIPC) を阻害剤と

表1 PCCaseTESTによる β-ラクタマーゼの検出

β-ラクタマーゼ型 ¹⁾			検査株数	PCCaseTEST		同定可能株数
ESBL	class A	class C		P	C	
○	*	*	21	+	-	21
*	○	*	22	+	-	22
*	*	○	37	-	+	2
				+ ²⁾	+	35
○	*	○	1	+	+	1
*	○	○	6	+	+	6

¹⁾ UV法により決定した

²⁾ 偽陽性

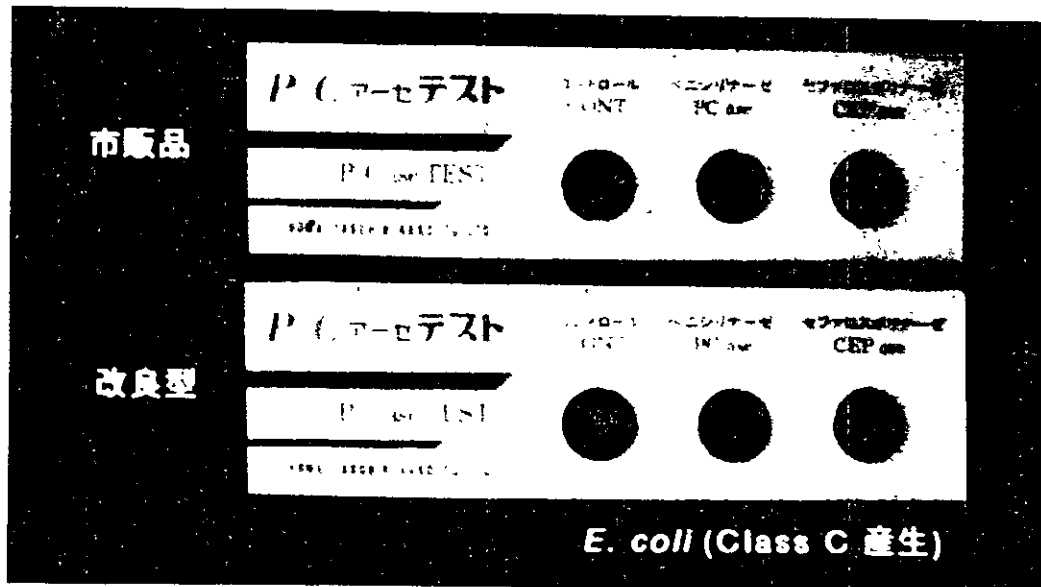


図2 PCASETESTの改良

して用いることとした。ディスク当たり $100\mu\text{g}$ の MCIPC を添加することにより、Class C β -ラクタマーゼによる偽陽性反応は完全に抑制された(図2)。しかもこの濃度の MCIPC では Class A β -ラクタマーゼの陽性反応には影響しなかった。

(4) 改良型 PCASETEST による迅速診断

β -ラクタマーゼ産生大腸菌 87 株について改良型 PCASETEST を用いた迅速診断を行い、UV 法による同定結果と比較した。(表2)。その結果、Class A β -ラクタマーゼ産生菌については 22/22 (100%) の同

定が可能であった。また、Class C β -ラクタマーゼ産生菌についても偽陽性反応は認められず、37/37 (100%) の同定が可能であった。ESBL 産生菌については CFPM の MIC ($\geq 2\mu\text{g/ml}$) と合わせると 20/21 (95%) の同定が可能であった。また、2 種類の β -ラクタマーゼを産生している菌株についても同定できることも明らかになり、全体で 99% の同定率であった。

D. 考察

β -ラクタマーゼ産生大腸菌を用いて PCASETEST

表2 改良型PCASETESTを用いた β -ラクタマーゼの検出

β -ラクタマーゼ型 ¹⁾			検査株数	CFPMの MIC ²⁾	PCASETEST		同定可能株数(%)
ESBL	class A	class C			P	C	
*	○	*	22		+	-	22 (100)
*	*	○	37	≤ 1	-	+	37 (100)
*	○	○	6		+	+	6 (100)
○	*	*	21		+	-	20 (95)
○	*	○	1	≥ 2	+	+	1

¹⁾ UV法により決定した

²⁾ cefepimeのMIC($\mu\text{g/ml}$)

による β -ラクタマーゼの迅速診断について、その有用性と問題点を検討した。現在市販されているPCaseTESTでは、Class C β -ラクタマーゼの多量産生菌で偽陽性反応の問題点が明らかになったが、今回の検討で問題点を改良することができた。改良型PCaseTESTは、これまで検査室における β -ラクタマーゼ検査の対象外であった腸内細菌や緑膿菌などの β -ラクタマーゼの診断にも有用であることが期待される。しかし、現時点ではESBL産生菌や2種類の β -ラクタマーゼ産生菌の特定にはCFPMのMICを参考にしなければならず、菌株のMIC結果を待たずに酵素のクラス分類が可能な方法を開発することは、より一層の迅速診断につながるため今後の検討課題である。もう一つの問題点は、改良型PCaseTESTでは、最近セラチアや緑膿菌からの検出頻度が多くなりつつあるClass B β -ラクタマーゼの検出ができないことである。この点についても最適なClass B酵素阻害剤の探索を行い、PCaseTESTに応用可能か否か検討することとしている。

E 結論

β -ラクタマーゼ産生大腸菌 87 株を用いてPCaseTESTによる β -ラクタマーゼの迅速診断について検討した。市販されているPCaseTESTの問題点であるClass C β -ラクタマーゼの多量産生菌の偽

陽性反応を抑制するために、MCIPCを用いて改良を行った。その結果、改良型PCaseTESTとCFPMのMICを組み合わせることにより99%の同定率でClass A β -ラクタマーゼ、Class C β -ラクタマーゼ、ESBLsを分別して検出することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsuhisa Inoue, Akio Kuga, Chieko Shimauchi, Hisakazu Yano and Ryoichi Okamoto: Why do antimicrobial agents become ineffectual? *Yonsei Med. J.* 39(6), 1999, in press.

Yoshimi Matsumoto and Matsuhisa Inoue: Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 307-313, 1999.

2. 学会発表

岡本了一, 小磯 剛, 佐藤優子, 久我明男, 井上松久: β -ラクタマーゼ検査用剤PCase TESTの問題点とその改良について. 第46回日本化学療法学会総会, 1998年, 和歌山. (日本化学療法学会雑誌, 46(suppl. A): 88, 1998.)

病原細菌の生産するβ-ラクタマーゼのクラス鑑別法の考案

分担研究者 澤井哲夫

研究協力者 小原康治、中村昭夫、内藤泰代、仲澤今日子
千葉大学薬学部微生物薬品化学研究室

研究要旨

臨床分離菌の生産するβ-ラクタマーゼのクラス鑑別を、β-ラクタマーゼ阻害剤を利用して簡便に行う方法を考案した。阻害剤としてclavulanic acid(CVA;クラスA, D 阻害)、Syn2161(monobactam誘導体;クラスC 阻害)、J110, 441(carbapenem 誘導体;クラスB 阻害)を用いた。阻害効果はampicillinの抗菌効果(MIC)から判定し、MICは微量液体希釈法により測定した。生産するβ-ラクタマーゼのクラス・比活性の明らかな7菌種、計14菌株を対象に行い、クラスA, D/クラスB/クラスC/基質拡張型クラスC、の4群が明瞭に鑑別できた。昨年度研究で確立した迅速MIC測定法(ルシフェラーゼ発光法)を適用すれば、鑑別時間を5分の一以下に短縮でき、同一の判定結果が得られる。

A. 研究目的

β-ラクタマーゼは病原細菌のβ-ラクタム剤耐性の主な原因となる薬剤不活化酵素群である。酵素遺伝子および酵素化学的特性からクラスA～Dの4クラスに分類される。クラスAはペニシリナーゼ型β-ラクタマーゼ、クラスCはセファロスポリナーゼ型β-ラクタマーゼ、クラスDはオキサシリンなどの難分解性ペニシリン剤も分解できるペニシリナーゼ型β-ラクタマーゼである。これらクラスA、C、Dは活性中心にセリンを持つセリン・β-ラクタマーゼに属する。クラスBは活性中心に亜鉛を持つメタロβ-ラクタマーゼであり、カルバペネム剤などの難分解性β-ラクタム剤も分解可能な幅広い基質特異性を持つ。さらに、セリン・β-ラクタマーゼから突然変異により、β-ラクタマーゼ抵抗性の新β-ラクタム剤に適応した変異酵素(基質特異性拡張型)が出現している。

感染症起因菌に対する最も適切なβ-ラクタム剤選択には、菌の生産するβ-ラクタマーゼのクラス型の情報が必要である。β-ラクタマーゼのクラス分類は従来、研究室レベルで行われてきたが、これを医療現場で簡便かつ迅速に実施できる方法が求められる。本研究では、現在までのβ-ラクタマーゼに関する基礎研究の知識を基に、各クラス酵素に特異的な酵素阻害剤を用いるβ-ラクタマーゼ・クラス鑑別法の考案を行った。

B. 研究方法

使用菌株はE. coli 5株、Enterobacter cloacae 3株、Klebsiella pneumoniae 1株、Citrobacter freundii 2株、Proteus mirabilis 1株、Proteus vulgaris 1株、Morganella morganii 1株、である。これら菌株の性質を表1に示す。MICの測定は、医療機関で多く用いられている方法を考慮して、日本化学療法学会の規定による微量液体希釈法を用いた。

阻害剤としては、クラスA β-ラクタマーゼの特異的阻害剤として使用されているCVA(oxapenam)、クラスCの特異的阻害剤としてSyn2161(monobactam誘導体)、クラスBの特異的阻害剤としてJ110, 441(carbapenem 誘導体)を用いた。Syn2161とJ110, 441は試験段階の新化合物であるが、鑑別試薬としての実用化が可能である。

C. 研究結果と考察

併用β-ラクタム剤のMIC値に及ぼす阻害剤効果から、菌の生産するβ-ラクタマーゼのクラスを鑑別する。生産する酵素の諸性質が当研究室で最もよく研究されたβ-ラクタマーゼ生産菌7株を用いて基礎的条件を詳細に検討した。各クラスβ-ラクタマーゼ生産菌に共通して適用可能な併用β-ラクタム剤を検討し、ampicillinを採用した。阻害剤濃度は1濃度に固定した。表2に阻害剤最適濃度の検討結果として、クラスC阻害剤(Syn2161)の例を示す。他阻害剤でもほぼ同様の結