

表1 使用菌株の性質

菌 株	性 質
E. coli ML1410	K12 由来 β -ラクタム剤感受性株
E. coli /RGN823	TEM 型クラスAの多量生産株
E. coli /RGN14	TEM 型クラスA生産株
E. coli /RGN238	クラスD生産株(oxa 1型)
E. coli /RDK4	クラスB生産株 (IMP-1)
E. coli 255	染色体性クラスC生産株
C. freundii GN346	染色体性クラスC生産株
C. freundii GC3	染色体性クラスC生産株 (基質特異性拡張変異)
E. cloacae P99	染色体性クラスC生産株
E. cloacae 363	染色体性クラスC生産株
E. cloacae GC1	染色体性クラスC生産株 (基質特異性拡張変異)
K. pneumoniae GN69	染色体性クラスA生産株
P. mirabilis N29	染色体性クラスA生産株
P. vulgaris GN76/C1	染色体性クラスA生産株 (誘導 \Rightarrow 構成型変異)
M. morgani 1510	染色体性クラスC生産株

表2 β -ラクタマーゼ阻害剤 Syn2161の併用効果

クラス	菌 株	MIC of ampicillin (μ g/ml)				
		Syn2161/ μ g/ml	0	5	10	20
n o n	E. coli ML1410	6.3	3.1	3.1	3.1	<1.6
A	E. coli/RGN823	>1600	>1600	>1600	>1600	>1600
B	E. coli/RDK4	25	25	25	25	25
C	C. freundii GN346	800	25	12.5	1.6	<1.6
C	E. cloacae P99	>1600	100	25	12.5	3.1
D	E. coli/RGN238	800			800	
C/拡張型	C. freundii GC3	>1600	>1600	>1600	>1600	800
C/拡張型	E. cloacae GC1	>1600	>1600	>1600	>1600	800

表3 Ampicillinと3種阻害剤の併用効果

クラス	菌 株	MIC of ABPC (μ g/ml)			
		0	CVA	Syn	J110
n o n	E. coli ML1410	6.3	3.1	3.1	3.1
A	E. coli/RGN823	>1600	12.5	>1600	>1600
B	E. coli/RDK4	25	12.5	25	3.1
C	C. freundii GN346	800	200	1.6	400
C	E. cloacae P99	>1600	800	12.5	800
D	E. coli/RGN238	800	25	800	800
C/拡張型	C. freundii GC3	>1600	800	>1600	>1600
C/拡張型	E. cloacae GC1	>1600	800	>1600	>1600

CVA : 10 μ g/ml、 Syn2161: 20 μ g/ml、 J110.441: 10 μ g/ml

表 4 各菌種 β -ラクタマーゼ生産菌への適用

クラス	菌 株	MIC of ABPC ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	CVA	Syn	J110
A	<i>E. coli</i> /RGN14	> 800	12.5	> 800	> 800
	<i>K. pneumoniae</i> GN69	> 800	1.6	> 800	100
	<i>P. mirabilis</i> N29	> 800	12.5	> 800	> 800
	<i>P. vulgaris</i> GN76/C1	800	1.6	800	6.3
C	<i>E. coli</i> 255	400	400	6.3	400
	<i>E. cloacae</i> 363	800	400	3.1	400
	<i>M. morgani</i> 1510	800	400	1.6	6.3

表 5 3 種阻害剤の阻害パターン

クラス	CVA	Syn	J110
A	+++	-	-
B	+	-	+++
C	+	+++	+
D	+++	-	-
C/拡張型	+	-	-

果が得られ、阻害剤の特性による明瞭な阻害パターンが観察された。Syn2161 の採用濃度としては $20 \mu\text{g/ml}$ を採用した。この濃度は使用菌株に対する Syn2161 自身の抗菌活性(MIC) の $1/10$ 以下の濃度である。他の 2 阻害剤では $10 \mu\text{g/ml}$ を採用し、阻害剤 MIC の $1/5 \sim 1/20$ 濃度である。いずれも阻害剤の抗菌活性の判定結果への影響は低いと考えられる。

β -ラクタマーゼ生産 7 菌株に対する、3 種阻害剤適用濃度における ampicillin の MIC 値を表 3 に示した。クラス D 生産菌はクラス A 生産菌と同様に CVA のみにより阻害効果を受け、両者は区別できない。クラス D β -ラクタマーゼはクラス分類初期はクラス A に属し、酵素化学的性質ではクラス A に類似した酵素である。臨床的な β -ラクタム剤選択では区別の必要性は低いと考えられ、両者を区別するために鑑別法を複雑にすることを避けた。

基質特異性拡張型クラス C β -ラクタマーゼ生産菌は 3 阻害剤の影響を受けない。同様の結果が予測される耐性菌として、基質特異性拡張型クラス A β -ラクタマーゼ生産菌が考えられる。今後の β -ラクタム剤使用でこれら変異 β -ラクタマーゼ生産菌は最も注意すべき耐性菌である。一方、臨床的に分離されるクラス A/C の 2 種 β -ラクタマーゼの生産菌は、CVA/Syn の 2 種阻害剤併用により鑑別可能と考えられる。また、緑膿菌を対象とする場合、併用 β -ラクタム剤を carbenicillin に代え、同様の原理で鑑別法の適用が可能と考えられる。

主に菌種特異的クラス A 又は C 生産菌を対象に本鑑別法を適用し、ほぼ同様の結果が得られた(表 4)。但し、2 菌種では J110, 441 の阻害効果が見られた。これらは同一クラス中でも、他と異なる性質が知られる菌種特異的 β -ラクタマーゼである。

D. 結論

3種の β -ラクタマーゼ阻害剤とampicillinの併用により、医療機関で一般的に使用されているMIC測定システムを利用して、臨床分離菌の生産する β -ラクタマーゼのクラス鑑別が容易に実施できる(表5)。さらに、リシフェラーゼ発光法(ATP法)を採用した場合、3時間30分程度で結果が得られる迅速鑑別法となる。また本研究で示した原理は、ろ紙ディスクによる鑑別法にも適用可能である。

E. 研究発表

学会発表

1. 霜島正治、由川英二、水岡慶二、服部憲晃、村上成治、小原康治、澤井哲夫
ATP法の迅速薬剤感受性試験への応用；臨床分離株を用いた実用性の評価、第46会日本化学療法学会総会、和歌山市、1998年6月
2. 服部憲晃、村上成治、小原康治、澤井哲夫
ATP法の迅速薬剤感受性試験への応用；MIC測定とその再現性の検討、第46会日本化学療法学会総会、和歌山市、1998年6月

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

分担研究者 中江 太治 東海大学医学部 分子生命科学部門

研究要旨

緑膿菌の多剤交叉耐性は先天性耐性及び後天的耐性のいずれの場合にも薬剤耐性ポンプ及び外膜透過性の低さが関わっていることが知られている。中でもMexA,B-OprMポンプは構造的に関連の薄い多くの抗生物質を能動的に排出することから臨床的にも問題の多い耐性因子である。そこで本研究においてはMexA,B-OprMポンプの発現状態を迅速に診断するための方法を開発すると共に、開発された方法を用いて臨床分離緑膿菌におけるMexA,B-OprMの高度発現株の検索を行った。MexA,B-OprMが発現されると外膜にOprM蛋白が出現する。そこでOprMに対する多価抗体を調成し、これを用いたウエスタンブロット法でOprMの検出の方法を開発した。その結果、OprMの検出には寒天平板上のコロニーから得られた菌液を用いてウエスタンブロットすると約150分程度の短時間にMexA,B-OprMの出現が検出できることが明らかとなった。そこで病院の検体から得られた多剤耐性株を対称としてMexA,B-OprMの高度発現頻度を検定したところ多剤交叉耐性菌のうち約35~39%においてMexA,B-OprMポンプが発現していることが明らかとなった。従ってこの方法はMexA,B-OprMポンプの発現を迅速に診断する手段として応用可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

緑膿菌は免疫力の低下した患者に容易に感染を起こすことから院内感染の起因菌としてはMRSAなどと並んで大きな問題を残している。緑膿菌の感染症における薬剤排出ポンプとしては*nalB*遺伝子によって制御されるMexA,B-OprMポンプ、*nfxB*によって制御されるMexC,D-OprJポンプ及びポンプ及び*nfxC*によって制御されるMexE,F-OprNポンプなどが知られている。これらの薬剤排出ポンプのうち野生株で発現されていることが明らかとなっているものはMexA,B-OprMポンプのみであり他の二種類のポンプは発現されていない。しかしながら抗生物質の使用によって得られる獲得耐性菌の中には上記三種類のポンプの発現したものが含まれる。従ってこれらの排出ポンプの中でもMexA,B-OprMポンプは低レベル自然耐性及び高レベルの耐性共に関わっていることから耐性因子として重要である。そこで本研究においてはMexA,B-OprMポンプに発現している株を迅速に検出することを目的としてその方法の開発を行った。そして開発された手法を用いて臨床材料から得られた耐性菌の中でのMexA,B-OprM排出ポンプの発現を検索することを目的とした。

B. 研究方法

抗OprM抗体の精製—OprMに対する抗体は高度に精製したOprMをウサギに免疫することによって得た。この多価抗体はOprM-架橋アフィニティカラムに吸着させ未吸着成分を十分に洗浄した後それを弱酸性の条件下に溶出した。

菌液の作製及びメンブレンへの吸着—菌の浮遊液は液体培地もしくは寒天固形培地上に育成した菌から調成し、 $A_{600}^{1cm}=1.2\sim 0.15$ 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分加熱した後にその各々の100 μ lを吸引によりメンブレン上に吸着させブロットした。この膜を先に調成しておいた抗OprM抗体で75分間処理した後にブロッキング操作を行った後に2次抗体（抗ウサギIgGマウス抗体）で30分間処理を行った後に30分間発色反応を行った。OprM蛋白の発現は野生株における発現と同じ強度の発色をしめす耐性株の希釈倍数の違いにより判定した。

この全操作に要する時間は約15分程度であった（図1参照）

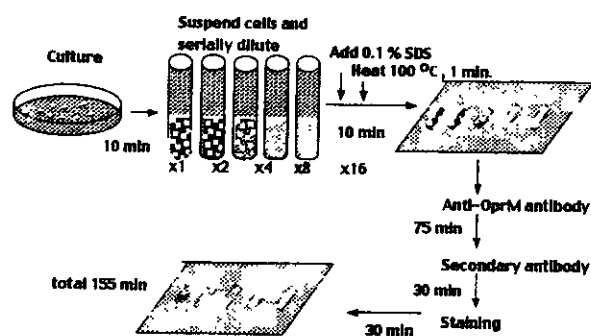


図1. ウエスタンブロット法による排出ポンプ検出の手順及びそれに要する時間

C. 研究結果

研究室保存株における実験—緑膿菌の標準株PAO1について液体培地から得られた菌体では $A_{600}^{1cm}=1.2$ の濃度のものの0.1mlを用いた時に至適の反応を得ることができた。そこでMexA,B-OprM排出ポンプの発現が亢進していることが明らかとなっているOCR1株及び

PA016006株におけるOprM発現を標準株PA01と同じ強度の反応を示す希釈倍数を求めたところ8倍希釈であるという結果が得られた。(図2)

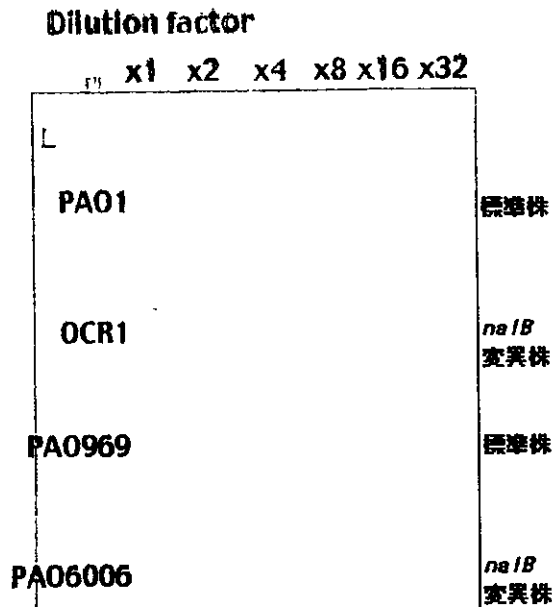


図2、標準株及び排出ポンプ高発現株を用いたOprM蛋白の検出

これらの変異菌のOFLX、CP及びCPRに対するMICはPA01株に比べ各々に4-8、82-4倍高い。従ってOprMの発現とこれらの抗生物質に対するMICの間には高い相関があることが明らかとなった。(図3)

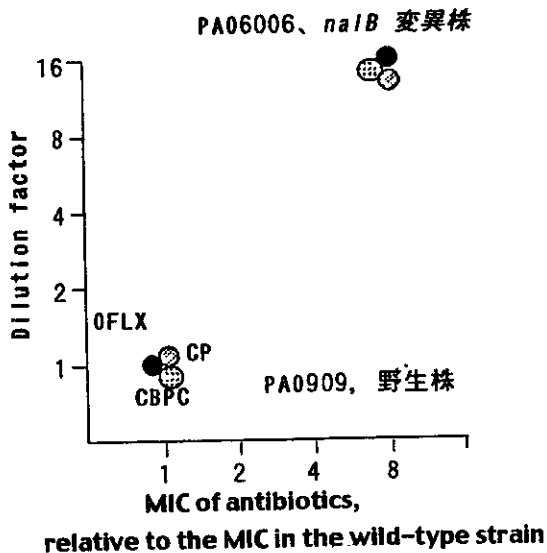


図3、野生株とnaIB変異株における抗生物質のMICとOprM発現の相関関係

次に検査に要する時間を短縮するために寒天培地上に発育したコロニーをかき取りそれから菌の浮遊液を調成して同様の実験を行ったところ、標準株では $A_{600}^{1cm}=0.3$ もしくは0.15程度で充分であることが判明した。そこで上記同様の実験をOCR1及びPA06006株について行ったところ共に16倍希釈の菌液を用いた時に親株の1倍希釈と同じ強度の反応を得た。以上の結果からこの方法を用いた排出孔進による多剤交叉耐性菌の診断にはコロニーから得られる菌液で充分であることが判明したので分離培地上のコロニーを直接かき取ってその菌浮遊液を実験に供すれば大幅に診断に要する時間を節約できることが明らかとなった。臨床分離耐性株における実験—以上述べてきた様な手段を用いた排出ポンプ亢進株の迅速診断法を臨床分離多剤耐性株に応用する実験を行った。病院から分離された耐性株205株を用いて上記同様の実験を行ってMexA,B-OprMの亢進した株を検出しそれらの菌株のピペラシリン、クロラムフェニコール及びオフロキサシンのMIC値との相関を測定した。(図4、5、6)

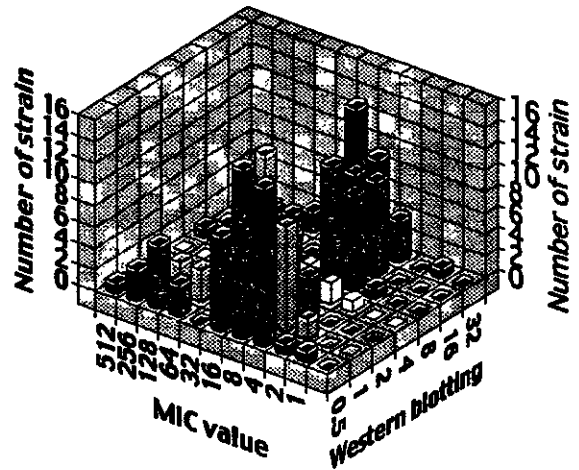


図4、多剤耐性臨床分離株におけるピペラシリンのMICとOprM発現の相関関係

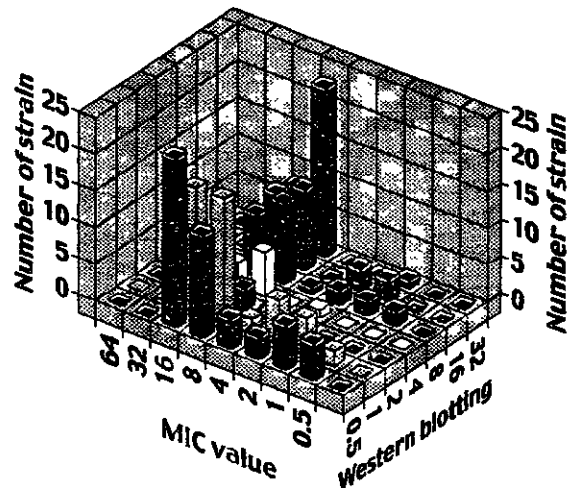


図5、多剤耐性臨床分離株におけるオフロキサシンのMICとOprM発現の相関関係

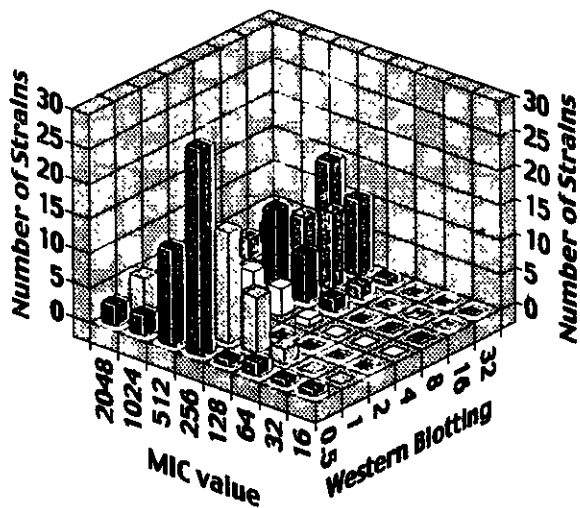


図6、多剤耐性菌床分離株における
クロラムフェニコールのMICとOprM発現の相関関係

その結果OprMが強く発現している菌株におけるピペラシリン、クロラムフェニコール及びオフロキサシン耐性株は205株のうち各々66株、80、77株であった。これらの数値は各々に全体の32、39及び37%に相当した。従って多剤に交叉耐性を示す緑膿菌の約35%近くはMexA,B-OprM排出ポンプを発現していることが明らかとなった。

D. 考察

緑膿菌の多剤交叉耐性に深い係わりを示すMexA,B-OprM排出ポンプの発現を診断する方法をウエスタンブロットの原理を応用して開発した。その結果分離培地上のコロニーから菌液を調成すれば分離培地後約3時間弱で排出ポンプ亢進株を検出できることが明らかとなった。本方法を用いたOprMの検出とオフロキサシン、カルベニシリン、ピペラシリン、セフピローム及びクロラムフェニコールの耐性との相関を調べたところいずれの薬剤とも高い相関があることがわかった。一方MexA,B-OprM排出ポンプの亢進によって耐性化しないことが知られているイミペネムでも約15%の菌株がOprMの高発現株と一致した。しかしながらこれらの株におけるイミペネム耐性はOprDポーリンの欠損もしくはβ-ラクタマーゼの高発現などによるものと解釈できそのような株がOprM発現株中に存在するものと解釈することができた。

E. 結論

抗OprM抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて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を開発した。その結果分離培地上から菌液を調成して実験に供すると約3時間以内にこの排出ポンプの発現を診断すること

が可能となった。この方法で診断された、MexA,B-OprM高発現株ではこのポンプによって排出されることが明らかとなっている数種の抗生物質のMICとの間に高い相関が見られた。従ってこの方法はMexA,B-OprM排出ポンプの亢進による耐性菌の迅速診断法として充分使用可能であることが明らかとなった。

F. 研究業績

Yoneyama, H., Ocaktan, A., Gotoh, N., Nishino, T., and Nakae, T. 1998, Subunit Swapping in the Mex-Extrusion Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*. 244, 898-902

中江太治、石井純子 1998 緑膿菌の多剤交叉耐性と薬剤排出 現代医療 30, 1249-1254

Keiko SUZUKI, Taiji NAKAE, Shigeki MITAKU 1998, Flocculation and Membrane Binding of Outer Membrane Protein F, Porin, at Acidic pH *Jpn. J. Appl. Phys* 37, 2074-2077

Eisaku Yoshihara, Hirosh Yoneyama, Toshihisa Ono, Taiji Nakae 1998, Identification of the Catalytic Triad of the Protein D2 Protease in *Pseudomonas aeruginosa* *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATION* 247, 142-145

Akira Nakajima, Mie Hoshikawa, Taiji Nakae 1998 Antibiotic stress induces a large amount of outer membrane protein in *Pseudomonas aeruginosa* *FEMS Microbiology Letters* 165, 261-265

中江太治 1998, 非特異的抗生物質耐性の機序 *Clinical View* 4, 4-5

中江太治 編集 1998 生物学と医学をつなぐ分子細胞生物学 教科書 丸善株式会社 300

Lan Guan, Michael Ehrmann, Hiroshi Yoneyama and Taiji Nakae 1999, Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* In Press

Hiroshi Yoneyama and Taiji Nakae 1999, Localization and membrane topology of the membrane fusion portein, MexA, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* submitted

Taiji Nakae, Akira Nakajima, Toshihisa Ono, Kohjiro Saito and Hiroshi Yoneyama 1999, Resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* by interplay between the MexA,B-OprM efflux pump and beta-lactamase *Antimicrob. Agents Chemother.* submitted

生貝 初、中江太治、島村忠勝 1998 コレラ菌エルツール溶血毒は集合体形成においてコレステロールを必要とする *日本細菌学雑誌* 53212 第71回日本細菌学会総会

岡本清美、後藤直正、辻元秀人、良原栄策、中江

太治、西野武志 1998 緑膿菌外膜蛋白質OprE3
をコードする構造遺伝子oprQのクローニング日本
細菌学雑誌 53 174 第71回日本細菌学会総
会

米山 裕、中江太治 1998 緑膿菌の薬剤排
出ポンプのサブユニットMexAのトポロジー解析
日本細菌学雑誌 53 171 第71回日本細菌
学会総会

中嶋 輝、中江太治 1998 抗生物質ストレ
スによって誘導される緑膿菌の外膜タンパク質日
本細菌学会誌 53 173 第71回日本細菌
学会総会

斉藤孝二郎、米山 裕、中江太治 1998 異物
薬物排出に関わるmexオペロンの発現制御をモニ
ターできる発現系の構築 日本細菌学雑誌 53
172 第71回日本細菌学会総会

中江太治、Ocaktan Aydin、米山 裕 1998 蛍光
プローブを用いた薬剤排出ポンプ 日本細菌学
会誌 53 170 第71回日本細菌学会総会

良原 栄策 1998 緑膿菌の薬剤排出ポンプの構
成タンパク質OprMはチャンネルを形成する 日本
細菌学会誌 53 171 第71回日本細菌学会総
会

細菌の薬剤耐性機構の分子解析と耐性機序迅速検出法に関する研究 (マクロライド耐性機序と耐性菌の迅速検出法)

分担研究者 中島良徳 北海道薬科大学 微生物学研究室

研究要旨

臨床分離黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: プ菌) におけるマクロライド抗生物質 (Mac) 耐性機序は、その殆どが *erm* 遺伝子にコードされた rRNA methylase による 50S リボソーム亜粒子の質的変化に基づく。しかし、最近大腸菌の Mac 不活化遺伝子 *mphB* と 50% ホモロジーのある *mphBM* 遺伝子を臨床分離 MLS 耐性 プ菌 plasmid より世界に先がけ見出した。

本研究では、臨床分離 プ菌株における Mac 不活化遺伝子 *mphBM* の保有状況の調査を行うと共に、Mac 耐性の 90% 以上を占める *erm* 遺伝子について、臨床検体からの直接高感度検出法の検討を行った。その結果、Mac 不活化遺伝子 *mphBM* が関与する Mac 耐性 プ菌は蔓延していないことが示唆された。また、*erm* 遺伝子は、耳腔または鼻腔拭い液いずれの場合も PCR 法により、 10^2 オーダーで検出可能であった。

A. 研究目的

マクロライド抗生物質 (Mac) に耐性を示す黄色ブドウ球菌 (プ菌) の既知耐性遺伝子には、1. Mac の作用部位である 23S rRNA をメチル化し、リンコサマイド (LCM) やストレプトグラミン B (STG-B) 抗生物質に交差 (MLS) 耐性を示す *erm* 遺伝子、2. 一部の Mac 及び STG-B を能動的に排出する *msr* 遺伝子、3. STG-B を加水分解する *sbh*、LCM を修飾する *lin* 遺伝子などが知られている。

近年当研究室において、臨床由来 プ菌の Mac 耐性 plasmid pMS97 上に *erm* と *msr* を併せ持つことを見出した。また最近、この plasmid について更なる解析を行ったところ、*erm* と *msr* に加え大腸菌の Mac 不活化遺伝子 *mphB* と 50% ホモロジーのある *mphBM* 遺伝子が同一 plasmid 上に存在していることを、我々はシーケンスの結果初めて明らかにした。そこで、臨床分離 プ菌における本遺伝子の保有状況を調査した。

一方、PCR 法による Mac 耐性遺伝子の迅速・高感度検出について、これまでに基礎的検討を行い改善を加えた結果、*erm*、*msr* 遺伝子ともに、 10^2 オーダーの菌量で検出可能であった。また、Mac 耐性 プ菌の 90% 以上は *erm* 遺伝子介在性の MLS 耐性を示すことが知られており、1993 年北海道内臨床分離 プ菌 113 株 (含 MRSA 104 株) について、PCR/RFLP 法により、*erm* 遺伝子型を調べたところ、112 株 (99%) が *ermA* を保有していた (表 1)。そこで、*ermA* 保有 プ菌 ISP447 株を材料として、健康人の耳腔及び鼻腔拭い液からの *ermA* 遺伝子の直接高感度検出法の可能性について検討を行った。

B. 研究方法

使用 *S. aureus* 株: プ菌 NCTC8325 (pMS97) 株, 誘導型 MLS 耐性 *ermA* を染色体上に保有する株 ISP447 及び臨床分離 MLS 耐性株 177 株。

mphBM 遺伝子の PCR 法及びサザンハイブリダイゼーション法による検出: *S. aureus* をリゾスタフィン処理後、フェノール法により抽出した total DNA を template とした。

mphBM 遺伝子の検出は、*mphBM* 遺伝子の内部配列 (5' -ATTTACACAACATACCAGA-3', 5' -GGTAAAGCTGGAGGTGAAAT-3', 377bp) を含むようにプライマーを設計し、94°C, 2min 15sec の後、94°C, 45sec, 55°C, 30sec, 72°C, 90sec を 30 サイクル行い、最後に 72°C, 10min で PCR 反応を行った。

サザンハイブリダイゼーションは、*mphBM* 遺伝子の内部配列 (5' -AGTAGAATGGGTTTTG-AGAC TGC-3', 5' -GGTAAAGCTGGAGGTGAAAT-3', 642bp) を含むように設計したプライマーにより、プ菌 NCTC8325 (pMS97) 株抽出 plasmid を template として得られた PCR product をプローブとして用い、臨床分離株の PCR product (377bp) との間でサザンハイブリダイゼーションを行った。

臨床検体からの *ermA* 遺伝子直接高感度検出法の検討: Phosphate buffered saline (PBS) に浮遊させた健康人の耳腔及び鼻腔拭い液に、*ermA* 保有 ISP447 株を $10^8 \sim 10^6$ CFU/ml 添加したものを検体として用いた。この検体を沸騰水浴中 10 分間加熱、氷冷後 15,000rpm、1 分間遠心した上清を直接熱抽出サンプルとした。同様に、検体に 0.1%

表1 Distribution of *erm* genes among 113 MLS-resistant *S. aureus* strains isolated in Hokkaido during 1993

Phenotype*	<i>erm</i> gene			
	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>ermA+ermB</i>
A group MSSA	1	0	0	0
MRSA	91	0	0	2
B group MSSA	0	0	1	0
C group MSSA	7	0	0	0
MRSA	12	0	0	0
Total	110	0	1	2
		113		

* A group : constitutive MLS resistance

B group : inducible MLS resistance (EM- and OL-inducible type)

C group : inducible MLS resistance (EM-inducible type)

dithiothreitol (DTT)を同容量加え、30秒間激しく攪拌均質化した後、15,000rpm、1分間遠心して沈査を集め、これをTE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5) に再浮遊させ、沸騰水浴中10分間加熱、氷冷後15,000rpm、1分間遠心した上清を DTT 処理熱抽出サンプルとした。ISP447菌体をPPBに浮遊させ、直接熱抽出したサンプルを陽性コントロールに、菌体無添加の拭い液を陰性コントロールとしてPCR法により *ermA* 遺伝子の検出を行った。PCRは、ユニバーサルプライマーを用いるArthurらの方法¹⁾に従って行った。

1) Arthur M., Molinas C., Mabilat C. and Courvalin P. (1990) *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2024-2026.

C. 研究結果

mphBM 遺伝子のPCR法及びサザンハイブリダイゼーション法による検出：北海道内臨床Mac耐性菌177株(含MRSA101株)について、total DNAを抽出後Mac不活化遺伝子 *mphBM* のPCR法による検出、および得られたproductに対するサザンハイブリダイゼーション法による *mphBM* の確認を行った。その結果PCRでは11株においてPCR product (377bp) が得られた(図1)。しかし当該productに *mphBM* をprobe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った(図2)。

臨床検体からの *ermA* 遺伝子直接高感度検出法の検討：PBS菌体浮遊液(陽性コントロール)のみ

の熱抽出液をtemplateにPCRを行ったところ、 10^2 オーダーでの検出が可能であることが確認された。また、菌体無添加の耳腔および鼻腔拭い液からは *ermA* 遺伝子は検出されなかった。このことより、拭い液中にはMac耐性菌が存在していないか、あるいは存在していても検出限界以下であることが確認された。耳腔拭い液では、サンプルの前処理無しでも 10^2 オーダーでの検出が可能であったが、鼻腔拭い液では 10^0 オーダーでしか検出できなかった。そこで、鼻腔拭い液について更に検討を加えた結果、DTT処理により 10^2 オーダーまで検出感度を上げることが出来た(図3および表2)。

D. 考察

新しいMac耐性遺伝子 *mphBM* は、北海道内臨床Mac耐性菌177株において検出されなかった。これは *mphBM* が関与するMac耐性菌が蔓延していないことを示唆する。今後更に多くの臨床分離株についてPCR及びサザンハイブリダイゼーションのみならず不活化の有無についても検討を加え、この結論の確証を得ることが必要と思われる。

また、*ermA* 遺伝子のPCR法での検出は、耳腔拭い液ではサンプルのDTT処理無しでも 10^2 オーダーでの検出が可能であった。鼻腔拭い液ではDTT処理することにより 10^2 オーダーまで検出感度を上げることが出来た。今回の検討結果より、両拭い液から *ermA* 遺伝子は 10^2 オーダーでの検出

が可能となり、迅速診断に有効な方法と考えられる。しかし、臨床で得られる多くの拭い液中には、未知のPCR阻害物質が含まれている可能性が高いこと、更に、ブ菌感染症は、体表のみにとどまらず、血液、腸管、尿路からも分離されることから、今後より多種のサンプルについて検討を加え、より確かな検出法を確立する必要がある。

E. 結論

1. 大腸菌の Mac 不活化遺伝子 *mphB* と 50% ホモロジーのある *mphBM* 遺伝子が臨床分離 MLS 耐性ブ菌 plasmid より見出され、臨床分離ブ菌株における Mac 不活化遺伝子 *mphBM* の保有状況を調査した結果、*mphBM* が関与する Mac 耐性ブ菌が蔓延していないことを示唆した。
2. 今回の検出方法で *ermA* 遺伝子は、耳腔または鼻腔拭い液より 10^2 オーダーで検出可能であったことから、迅速診断に有効な方法と考えられる。

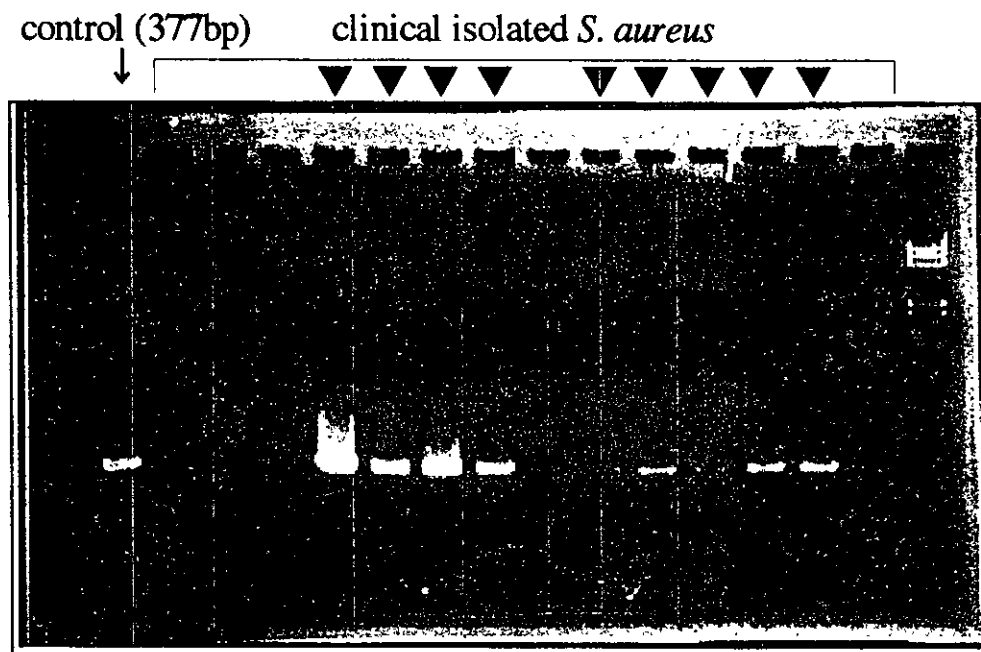


図 1 PCR amplification of *mphBM*.

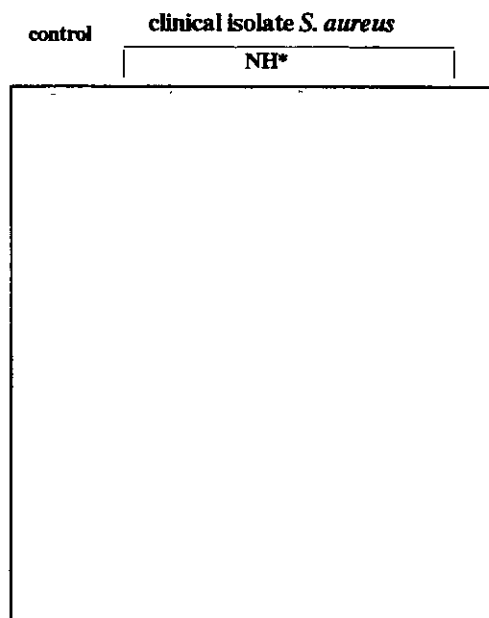


図 2 Southern hybridization of *mphBM*.
* NH : not hybridized

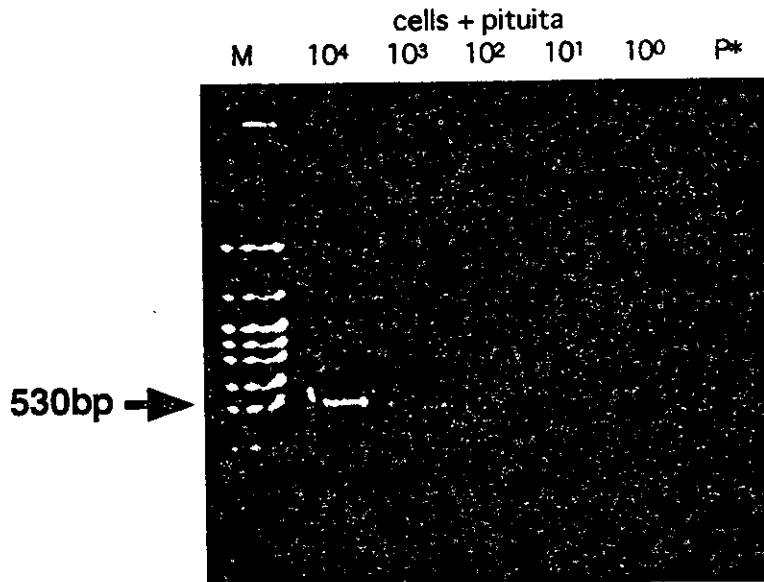


図1 Limits of identification of *ermA* gene.
* P : negative control

表2 各拭い液からの *ermA* 遺伝子の検出限界

菌体	直接熱抽出	1.6×10^2
鼻腔拭い液のみ	直接熱抽出	ND
耳腔拭い液のみ	直接熱抽出	ND
菌体+鼻腔拭い液	直接熱抽出	1.6×10^8
	DTT処理後熱抽出	1.6×10^2
菌体+耳腔拭い液	直接熱抽出	1.6×10^2
	DTT処理後熱抽出	1.6×10^2

ND: not detected

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Matsuoka, K. Endou, H. Kobayashi, M. Inoue and Y. Nakajima: A dyadic plasmid that shows MLS and PMS resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 148: 91-96 (1997).

M. Matsuoka, K. Endou, H. Kobayashi, M. Inoue and Y. Nakajima: A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 167: 221-227 (1998).

2. 学会発表

小林弘幸、松岡真由美、遠藤菊太郎、中島良徳
MLS 耐性黄色ブドウ球菌の *erm* 遺伝子型の識別、
日本細菌学雑誌、53, 189 (1998).

松岡真由美、小林弘幸、遠藤菊太郎、中島良徳
プラスミド pMS97 上に存在する2つのマクロライド
抗生物質耐性遺伝子 *msr* と *erm* の解析、第71回
日本細菌学雑誌、53, 191 (1998).

小林弘幸、松岡真由美、遠藤菊太郎、中島良徳
PCR法による臨床材料からの *erm* 遺伝子直接検出
法の基礎研究、第27回薬剤耐性菌シンポジウム要
旨集、(水上町)、pp. 49 - 50 (1998).

M. Matsuoka, M. Inoue and Y. Nakajima: A new class
of *erm* genes mediating MLS-coresistance in *Staphylo-*
coccus aureus; It resides on plasmid pMS97 together
with *msrSA'* gene coding for an active efflux pump.
American Society for Microbiology 38th Interscience
Conference on Antimicrobial Agents and
Chemotherapy. San Diego, California, 1998 (abstr
14352)

前田和徳、松岡真由美、遠藤菊太郎、小林弘幸、中
島良徳 黄色ブドウ球菌由来 plasmid pMS97 のマ
クロライド系抗生物質耐性遺伝子の解析とその表
現型、第66回日本細菌学会北海道支部学術総会要
旨集、(札幌市)、pp. 48 - 49 (1998).

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

分担研究者 堀田国元 (国立感染症研究所生物活性物質部)

研究要旨

アルベカシン (Arbekacin = ABK) 耐性のMRSAの*mec*遺伝子とABK耐性遺伝子*aac*(6')/*aph*(2")の両方を一度のPCRによって検出する方法を確立した。その方法を用いて、全国コレクションの薬剤耐性菌のうち、ABK耐性株として記載されているMRSA33株と未同定株10株における両遺伝子の存否を調べた結果、MRSA株ではいずれも*mec*遺伝子が検出されたが、二機能酵素遺伝子 *aac*(6')/*aph*(2") 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株において二機能酵素遺伝子が検出された。一方、アミノグリコシド耐性試験の結果、MRSAでは二機能酵素遺伝子陰性株はほとんどがABK感受性、陽性株は21株が中等度以下のABK耐性と判定され、臨床情報と相関性がなかった。未同定株では ABK高度耐性株が多く認められたが、二機能酵素遺伝子の存否とは相関性がなかった。菌学的性状試験の結果、未同定株はすべて腸球菌と判定された。

以上の結果から、今回確立した*mec*遺伝子と*aac*(6')/*aph*(2")遺伝子を同時に検出する方法は ABK耐性のMRSAを判定するために必須で有用な方法と結論できる。また、臨床において ABK耐性菌を分離する際、ABK耐性判定のための的確な培地の必要性があると考えられた。

協力研究者

石川 淳 国立感染症研究所生物活性物質部
吉良清子 国立感染症研究所生物活性物質部

A. 研究目的

抗MRSA剤であるアルベカシン (Arbekacin= ABK) に耐性のMRSAを迅速かつ的確に検出する方法として *mec*遺伝子とABK耐性遺伝子*aac*(6')/*aph*(2")をPCRにより同時検出する方法の確立を目的とした。具体的には、全国の医療施設由来の薬剤耐性菌のコレクション(感染研)の中からABK耐性菌として記載されたMRSAと未同定株を用いて、耐性遺伝子の検出の他、アミノグリコシド耐性と菌学的性状について試験し、耐性遺伝子の存否が臨床における耐性菌の菌学的判定やABK耐性判定と相関性があるかどうかを明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

1. 使用菌株

国立感染症研究所の全国コレクションの薬剤耐性菌のうち、アルベカシン (Arbekacin= ABK) 耐性株と記録されたMRSA33株と未同定株10株を用いた。

2. PCR

2.1 鋳型DNAの調製

エペンドルフチューブに入れた普通ブイオン (1 ml) にMRSAおよび未同定株を接種し、37℃一晩培養し遠沈した菌体を TE[10mM Tris-HCl(pH8.0) -10mM EDTA(pH8.0)] 1 ml で洗浄後、500 μl のTEに懸濁した。これにリゾチーム (1mg/ml)、リソスタフィン (10 μg/ml) を加え、37℃で30分インキュベート後、1/10容の10%SDSを加えて混和した後、RNase (終濃度10 μg/ml) とProteinase K(終濃度100 μg/ml) を加え、50℃でインキュベートした。30分後、等容のフェノール/クロロホルム (1:1) を加えて激しく混和後、遠心した。その上層 (水

層) に1/10容の3M酢酸ナトリウムおよび6/10容のイソプロパノールを加えて混和し、室温で10分間放置後遠沈した。上清を除去し沈澱を70%エタノールで洗浄、陰圧下で乾燥後、TEに溶解し、PCR用の鋳型DNA液とした。

2.2 プライマー

*mec*遺伝子および*aac*(6')/*aph*(2")遺伝子の検出のためのプライマーと予想されるPCR増幅産物のサイズを図1に示した。

2.3 PCR反応

PCR反応液の組成は以下の通りである：

DNAサンプル	1 μl
各プライマー	0.5 μM
dNTP	0.2 mM
Taqポリメラーゼ	1.25単位
反応液量	20 μl

PCR条件は以下の通りである：

95℃, 3分 → 「95℃, 30秒」 × 25回 → 72℃, 3分
| 50℃, 30秒 |
「72℃, 60秒」

PCRの産物は、反応終了後、アガロース (1.2%、1 x TAE) 電気泳動 (100V, 40mA) により検出した。

3. 耐性試験

AGを所定濃度に添加した食塩含有栄養寒天培地 (栄研) および酵母エキス・麦芽エキス培地 (ISP No. 2; Difco; 食塩非含有) に菌液5 μl (約10⁵cfu) をマイクロピペットでスポット接種し、37℃24および48時間培養し、コロニー生育を観察判定した。

4. 菌学的性状

血液寒天、S F、E Fの培地上での生育、コロニー形態、グラム染色・形態観察、カタラーゼおよびコアグララーゼ試験を行った。

C. 研究結果

1. PCRによる耐性遺伝子 [*mec*と*aac*(6')/*aph*(2'')]の検出

まず、昨年度の研究で*aac*(6')/*aph*(2'') 遺伝子をもつことを明らかにしてあった *Staphylococcus aureus* ARI9株 (MRSA)のDNAを鋳型として、*mec*および *aac*(6')/*aph*(2'') 遺伝子のPCR検出を検討した。その結果を図2に示したが、各遺伝子のプライマーの組み合わせで(図2の①~④)は設計通りいずれも明瞭な増幅バンドが検出された。一方、両遺伝子のプライマーを組み合わせた場合(図2の⑤~⑦)、いずれも予定通り2本の増幅バンドが認められたが、2本とも明瞭であったのは⑤の組み合わせであった。

そこで、⑤の組み合わせ、すなわち*mec*1, *mec*2, P1及びP1cの4種のプライマーを加えたPCR反応条件で、全国コレクションのABK耐性菌43株から調製したDNAを鋳型としてPCR反応を行った。その結果、図3に示した例のように、両遺伝子が検出されるもの、*mec*だけ検出される、*aac*(6')/*aph*(2'')だけが検出される、両方検出されない、という4つのケースが認められた。

表1に各菌株の結果をABK耐性試験の結果とともに示し、表2にはそれらを要約した。MRSAにおいてはいずれの場合も*mec*遺伝子が検出されたが、*aac*(6')/*aph*(2'')が認められたのは23株で、10株では検出されなかった。この10株はいずれもABK感受性であった。すなわち、*aac*(6')/*aph*(2'')遺伝子の存否とABK耐性レベルの間に明瞭な相関が認められた。

一方、未同定の10菌株では、いずれも*mec*が検出されず、5株において*aac*(6')/*aph*(2'')が検出された。

2. アミノグリコシド耐性

表1に食塩含有普通寒天培地(NA)および非含有培地(No. 2)において行ったABK耐性試験の結果を臨床情報(全国)のABK耐性と並べて示した。一見して、未同定株(*印)を除いて臨床情報と今回の試験結果の間に相関性が無いことが認められた。高度ABK耐性のMRSA株としては食塩含有普通寒天培地(NA)での試験で2株(100 µg/ml)認められたが、非含有培地では5 µg/ml耐性しか示さなかった。未同定株では、NA培地において25~>100 µg/mlの耐性が確認された。

表3には、NA培地で判定したABK耐性レベルに従ってABK耐性菌をグループ分けし、それらが他のアミノグリコシド抗生物質に対してどのような耐

性を示すかを耐性レベル単位で菌株で示した。

その結果、2、3の例外的なものを除いてABK耐性よりも低い耐性レベルを示すアミノグリコシドはなかった。

3. 菌学的性状

未同定の菌株10株およびMRSA株について表4に示した性状について試験した。

未同定株は、血寒上で透明感のある白色のコロニーを形成し、β、γ溶血が認められ、グラム陽性で連鎖状の形態を示した。また、SF培地とEF培地で発育した。カタラーゼとコアグラゼはマイナスであった。以上から、未同定株はいずれも腸球菌(*Enterococcus*)と判定され、うち9株は*E. faecalis*、1株は*E. faecium*と同定した。

MRSA株はすべて*S. aureus*の菌学的性状を示した。

D. 考察

今回の研究では、ABK耐性に関する臨床情報を確認することができなかった。すなわち、MRSAと記載された菌株のうち、*mec*遺伝子はあるがABK耐性遺伝子がない株が10株認められ、それらはいずれもABK感受性であることがわかった。一方、PCRによるABK耐性遺伝子の検出とABK耐性レベルの間には明確な相関性が認められる。一方、ABK耐性菌として分離された菌は、いずれも*mec*遺伝子を保持しておらず、腸球菌と同定された。これらの菌が分離されたのは、腸球菌の中にはMRSA選択培地に生えてくる可能性のあるものが存在することを示唆している。

したがって、本研究で確立した一度のPCRによる*mec*と*aac*(6')/*aph*(2'')の2つの遺伝子の検出法は、ABK耐性MRSAの検出と判定にとって必須かつ有用な方法と判断される。

また、ABK耐性レベルに関する臨床情報を今回の研究で確認することができなかった。すなわち、臨床情報よりはるかに低いABK耐性を認めただけであった。このことから、臨床においてABK耐性菌を分離し、ABK耐性レベルを調べるための的確な培地の必要性が痛感された。

一方、*mec*のみ検出されたMRSA10株の中、2株が5 µg/mlのABK耐性を示したが、これは2株のABK耐性因子が*aac*(6')/*aph*(2'')遺伝子と異なることを示唆している。今後、その耐性因子を解明し、迅速かつ確実な検出法を確立する必要もあると思われる。

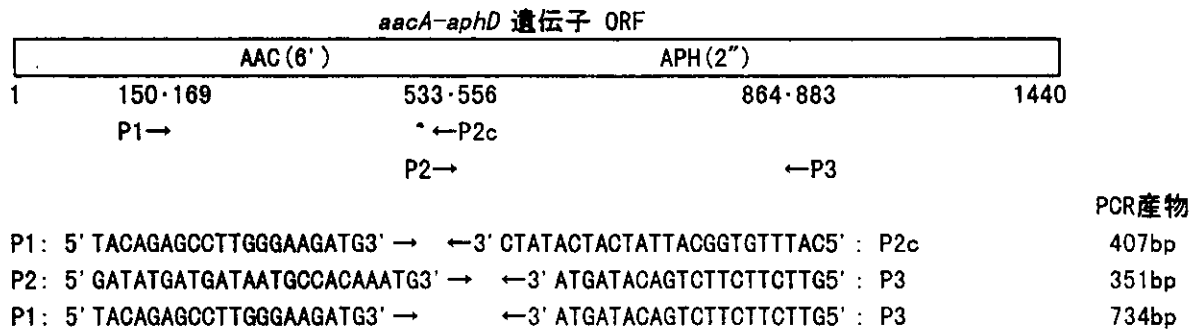
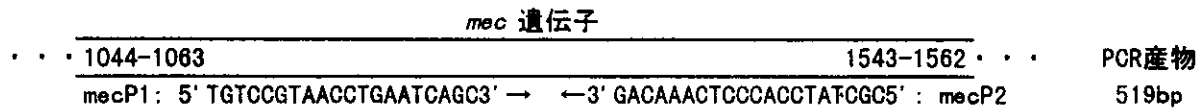


図 1. *mec* および AAC (6') / APH (2'') 遺伝子検出用の PCR プライマーと予想 PCR 産物

標的遺伝子 プライマー	<i>mecA</i>		<i>aac</i> (6') / <i>aph</i> (2'')		<i>mecA</i> + <i>aac</i> (6') / <i>aph</i> (2'')			
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
	<i>mec</i> 1 <i>mec</i> 2	P1 P2c	P2 P3	P1 P3	<i>mec</i> 1 <i>mec</i> 2	<i>mec</i> 1 <i>mec</i> 2	<i>mec</i> 1 <i>mec</i> 2	<i>mec</i> 1/2 P1, P2 P2c, P3

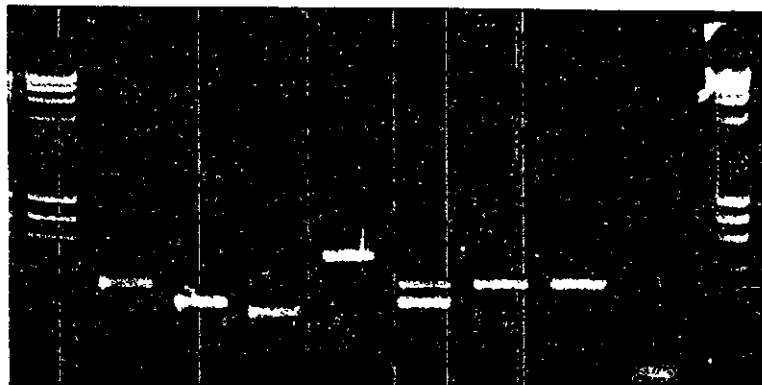


図 2. *mec* 遺伝子と *aac* (6') / *aph* (2'') 遺伝子検出のためのプライマーの組み合わせの検討

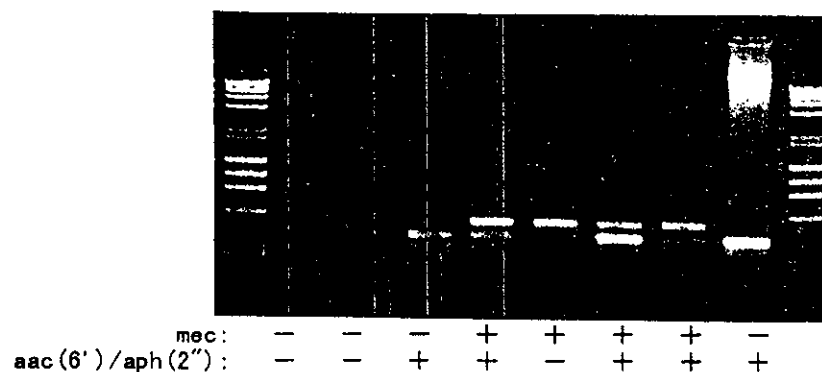


図 3. PCR によるアルベカシン耐性株の *mec* および *aac* (6') / *aph* (2'') 遺伝子の検出

表 1. 耐性遺伝子の存否と A B K 耐性

菌株 No.	P C R 増幅		A B K 耐性 **		
	mec	aac(6')/aph(2'')	全国	N A	No. 2
1	++	+	0.25	<5	<5
2	++	-	3	<5	<5
3	++	+	2	<5	<5
4	++	-	>128	<5	<5
5	++	-	2	<5	<5
6	++	-	2	<5	<5
* 7	-	-	128	25	5
8	++	-	2	<5	<5
* 9	-	++	>128	>100	5
10	++	-	4	<5	<5
11	+	++	>128	25	5
12	+	++	64	5	<5
13	++	-	64	5	<5
14	++	-	2	<5	<5
* 15	-	++	>128	25	5
* 16	-	++	>128	100	5
17	+	++	3	<5	<5
18	++	-	3	<5	<5
* 19	-	-	>128	>100	5
20	+	++	128	25	5
21	+	++	128	5	5
22	+	+	128	(25)	5
23	++	+	3	<5	<5
24	+	++	128	(25)	<5
25	+	+	3	5	<5
26	+	++	>128	(25)	5
27	+	++	8	<5	<5
28	+	++	128	5	<5
29	++	+	4	5	5
* 30	-	-	128	100	5
31	++	++	32	5	<5
32	++	++	128	100	5
* 33	-	-	128	25	5
* 34	-	-	128	25	<5
* 35	-	+	>128	25	<5
36	++	+	128	25	<5
37	++	(+)	2	<5	<5
38	++	++	>128	100	5
39	++	++	32	5	<5
* 40	-	++	>128	>100	5
41	++	+	128	5	5
42	++	+	128	5	<5
43	++	-	3	5	<5

* 未同定株

** 全国：臨床情報、NA：普通寒天培地（食塩含有）、No. 2：ISP No. 2 培地（食塩非含有）

表2. ABK耐性臨床分離株の耐性遺伝子、ABK耐性レベル及び菌学的性状

菌 株	耐性遺伝子と A B K 耐性				菌学的性状
	mec	aac/aph	株数	ABK耐性*	
MRSA 33株	+	+	23	<25	<i>S. aureus</i>
	+	-	10	< 5	<i>S. aureus</i>
未同定 10株	-	+	5	25~>100	<i>E. faecalis</i>
	-	-	4	25~>100	<i>E. faecalis</i>
			1	>100	<i>E. faecium</i>

* ABK含有普通寒天培地（食塩0.5%）での成績

表3. アルベカシン耐性菌株の各種アミノグリコシド耐性レベルと菌株数

A B K 耐 性 レ ベ ル	株数	Kanamycin				Dibekacin				Amikacin				Gentamicin				Isepamicin				Netilmicin				
		<5	5	25	100	<5	5	25	100	<5	5	25	100	<5	5	25	100	<5	5	25	100	<5	5	25	100	
<5	14	0	2	1	11	2	6	3	3	0	6	8	0	5	5	2	2	0	6	6	0	5	5	2	0	
MRSA	5	11	0	0	0	11	0	0	1	10	0	0	5	6	1	1	9	0	0	0	6	5	1	0	2	8
(33株)	25	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	2	4	0	1	0	5	0	0	1	5	0	0	1	5
	100	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2
未同定	25	5	0	0	1	4	0	2	1	2	0	0	2	3	0	2	1	2	0	0	1	4	0	1	1	3
(10株)	100	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5

* 耐性レベル：普通寒天培地における耐性レベル（ $\mu\text{g/ml}$ ）

表4. MRSAと未同定株の菌学的性状

	MRSA 33株	未同定株 9株	未同定株 1株
血液寒天	淡黄色、不透明	白色、透明感	同左
グラム染色	+	+	同左
形態	ブドウ状	連鎖状	同左
カタラーゼ	+	-	同左
コアグララーゼ	+	-	同左
S F 培地	発育せず	発育	同左
E F 培地	発育せず	発育：赤紫	黄色
判 定	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>

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

分担研究者 山口恵三 東邦大学医学部 微生物学教室
研究協力者 馬 リン、石井良和 東邦大学医学部 微生物学教室

喀痰から直接β-ラクタマーゼを検出することを目的に、*Pseudomonas aeruginosa*が分離された喀痰を対象としたβ-ラクタマーゼ活性の測定方法を確立した。喀痰からの抽出操作は30分以内に終了した。*P. aeruginosa*が 10^6 cfu/mL存在する喀痰からの抽出液を100 μMのニトロセフィン溶液に添加して5分間37℃で経時的に吸光度を測定したところ、きわめて良好な直線関係得ることができた。一方、 10^6 cfu/mLの*Enterococcus faecalis*が存在する検体からはβ-ラクタマーゼ活性は認められなかった。次ぎに検出された菌量が異なる複数の検体を用いて検出限界に関する検討を行った。その結果、*P. aeruginosa*が 10^5 cfu/mL以上の菌量が存在する検体からはβ-ラクタマーゼ活性が検出された。また、ペニシリナーゼを産生する*Escherichia coli*が 10^7 cfu/mL存在する喀痰の K_m 値は127 μMと大きな値を示し、セファロsporリナーゼを産生する*P. aeruginosa*の値とは大きく異なった。以上の結果から、今回検討した方法は迅速、簡便且つ高感度で検体からβ-ラクタマーゼを検出することが可能な方法であった。

A. 研究目的

臨床では感染症の原因菌が同定される以前に経験的な抗菌薬の投与がなされる場合が多いのが現実である。感染症の原因菌と考えられる微生物の耐性因子を検体から直接検出することが可能になれば、菌の分離、同定あるいは薬剤感受性検査の結果が出る以前に、よりの確かな抗菌薬の投与が可能になると考えられる。これまでも喀痰からのβ-ラクタマーゼ活性の測定に関しては、高速液体クロマトグラフィーを用いる方法が報告されているが操作が煩雑なことから結果が出るまでに時間を要することなどの理由から一般的な方法とはなっていない。

今回は検体から直接、簡便且つ迅速にβ-ラクタマーゼを酵素学的方法で検出することを目的として、現在最も高感度なβ-ラクタマーゼ検出試薬として知られているニトロセフィンを基質として用いる検出方法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 対象とした喀痰

呼吸器疾患の患者由来の喀痰で*Pseudomonas aeruginosa*が分離された9検体を対象とした。さらに、典型的なペニシリナーゼを産生する*Escherichia coli*が分離された喀痰も使用した。なお、喀痰から分離された菌種はVitek(日本ビオメリュー、東京)を用いて同定した。

2. 喀痰からのβ-ラクタマーゼの抽出方法

検体の処理は、喀痰200 μLを1.5 mLのマイクロチューブに移し、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0) 200 μLを加えてホモジナイザーでホモジネート後、1000,000 G、4℃にて15分間超遠心機を用いて遠心し、その上清を酵素液とした(図1)。

3. 分離された菌体からのβ-ラクタマーゼの抽出方法

各菌株をL-brothで一夜培養した5mLの菌液を3,500 rpm、4℃、15分間遠心して集菌した。その沈査を50mMのリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄し、100 μLの同緩衝液に再浮遊した後凍結融解を5回繰り返した。その後、1000,000 G、4℃、30分間の超遠心を行い、得られた上清を粗酵素液とした(図2)。

4. β-ラクタマーゼ活性の測定方法

酵素反応はBeckman自記吸光度計DU640恒温槽付きを用いて3mLの基質となるニトロセフィン溶液に試料となる酵素液50 μLを添加して、波長482nm、反応温度37℃で行った(表1)。

実験に先立ち100 μMの濃度のニトロセフィン溶液に*P. aeruginosa*が 10^6 cfu/mL検出された喀痰からの抽出液、*E. faecalis*が 10^6 cfu/mL検出された喀痰からの抽出液を50 μL添加して5分間のタイムスキャンを実施し、酵素との反応性を確認した。

基質となるニトロセフィンは10 μM、25 μMおよび100 μMの濃度の溶液を使用した。酵素活性の算出は、反応開始後1分間に生じるOD値の変化をもとに次式から行った。

$Activity = y / 1.59 \times 0.3 \times v$ ($v = 3.05 / 0.05 \times 2$, $y = \Delta OD / \text{min}$)
さらに、酵素学的パラメータはMichaelis-Menten plotを行いその座標をから算出した。なお、実験で得られた値は、Lineweaver-Burk plot、Eadie-Hofstee plot、Hanes-Woolf plotの各も同時に行った。

5. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は日本化学療法学会が定めた微量液体希釈法に準じて測定した。力価が明らかなpiperacillin(富山科学工業株式会社、東京)、imipenem(萬有製薬株式会社、

東京)、cefsulodine(武田薬品工業株式会社、大阪)、cefoperazone(ファイザー製薬株式会社、東京)、ceftazidime(日本グラクソ株式会社、東京)、cefpirome(プリストル・マイヤーズ・スクイブ株式会社、東京)およびaztreonem(エーザイ株式会社、東京)の各抗菌薬を対象薬剤とした。なお、培地はMuller-Hinton broth(Difco, USA)を使用し、接種菌量は約 5×10^5 となるように設定した。

C. 研究結果

1. ニトロセフィンと喀痰からの抽出液との反応性

*P. aeruginosa*が 10^6 cfu/mL検出された喀痰からの抽出液50 μ Lを用い、ニトロセフィン溶液と5分間、30秒毎に吸光度を測定しながら反応させた場合、きわめて良好な直線関係が得られた。同様に*E. faecalis*が喀痰から抽出された溶液の β -ラクタマーゼ活性 10^6 cfu/mL検出された喀痰からの抽出液を用いて5分間、経時的に吸光度を測定したが吸光度の変化は認められなかった(図3)。

2. 喀痰中 β -ラクタマーゼの活性測定

喀痰中からの抽出操作は30分以内に終了した。今回は*P. aeruginosa*が $10^4 \sim 10^7$ cfu/mL分離された喀痰を対象に検討を加えた。*P. aeruginosa*が分離された喀痰からは 10^4 cfu/mLの菌量でも十分に β -ラクタマーゼ活性の測定が可能であり、喀痰中に存在する β -ラクタマーゼの酵素学的パラメータをMichaelis-Menten plotから算出することが可能であった(表2)。さらに、そのデータをLineweaver-Burk plot、Eadie-Hofstee plot、Hanes-Woolf plotの各plotでも検討したが、いずれのplotにもよくフィットした。

3. 喀痰から分離された菌株の薬剤感受性成績

表3に各喀痰から分離された*P. aeruginosa*の各抗菌薬に対する薬剤感受性試験の成績を示した。I株を除く菌株のimipenemに対するMICは4 μ g/mL以上の値を示した。B株、C株およびF株のaztreonamに対するMIC値はそれぞれ、4 μ g/mL、8 μ g/mL、2 μ g/mLであったが他の菌株は16 μ g/mL以上の値を示した。

4. 喀痰から分離された菌株の β -ラクタマーゼ活性

喀痰から分離された菌株の β -ラクタマーゼ活性を表4に示した。C株およびE株の V_{max} 値が各々0.495 μ M/sec、0.673 μ M/secと高い値を示した。一方、A株およびF株から抽出した β -ラクタマーゼ活性は各々0.012 μ M/sec、0.011 μ M/secと低い値を示した。

D. 考察

現在まで、喀痰中 β -ラクタマーゼ活性の測定は、あらかじめ酵素と基質を反応させその分解産物を高速液体クロマトグラフィーで定量して求める方法が報告されている。し

かし、この方法は検体の処理が極めて煩雑であること、迅速に検査が行えないこと、酵素学的パラメータを算出することが困難なことなどの理由から一般的な方法とはなり得ないと考えられる。

今回検討した β -ラクタマーゼを検出する方法は、簡便、迅速且つ高感度な方法であった。さらに、酵素学的パラメータを算出することも可能であり、 V_{max} および K_m 値に対する解析を加えれば β -ラクタマーゼの型の推定も可能であるものと考えられた。しかし、現在問題となっている基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼや複数の型の β -ラクタマーゼが一つの菌体内に存在する場合などのデータの解析は今後の課題である。しかし、阻害剤との併用とその時の酵素学的パラメータの詳細な解析を加えれば、喀痰中に存在する β -ラクタマーゼの型もある程度判別することが可能となるものと思われた。

喀痰中 β -ラクタマーゼの活性と分離された菌種のMICとの間にいくつか食い違う結果が認められた。この結果が乖離した原因として、MIC測定をされる菌株は、喀痰中に存在する多くの菌株の中に存在する限られた菌株であることが挙げられる。したがって、MICを測定された菌株の値は、全ての菌株の代表値ではありえないと考えられる。

一方、今回報告した方法の問題点としては、検体を採取した時点で抗菌薬が投与されている場合が挙げられる。すなわち、 β -ラクタマーゼと投与された β -ラクタム系抗菌薬が結合している場合、正確な酵素学的パラメータを得ることはできないと考えられる。したがって、この方法を実施する場合に最も重要なことは、患者に対して投与されている抗菌薬に関する情報を得ることであると考えられた。

今後は喀痰以外の検体中に存在する β -ラクタマーゼの活性測定に関する検討を加えるとともに、様々な型の β -ラクタマーゼの酵素学的パラメータに関するデータを収集し、更なる応用の可能性について検討を加える予定である。

E. 結論

検体から直接 β -ラクタマーゼを検出する方法の確立を試みた。

検体からの抽出操作は30分以内に終了した。

β -ラクタマーゼを産生しない菌種のみが存在する喀痰からは β -ラクタマーゼ活性は検出されず、*Pseudomonas aeruginosa*が 10^5 cfu/mL以上存在する喀痰からは β -ラクタマーゼ活性が検出された。また、 V_{max} および K_m といった酵素学的パラメータの算出が可能であった。

この方法は既存の方法にはない長所があり、様々な検体から β -ラクタマーゼを検出することが可能であり、更なる応用が可能であると思われた。

図1 喀痰からのβ-ラクタマーゼの調製方法

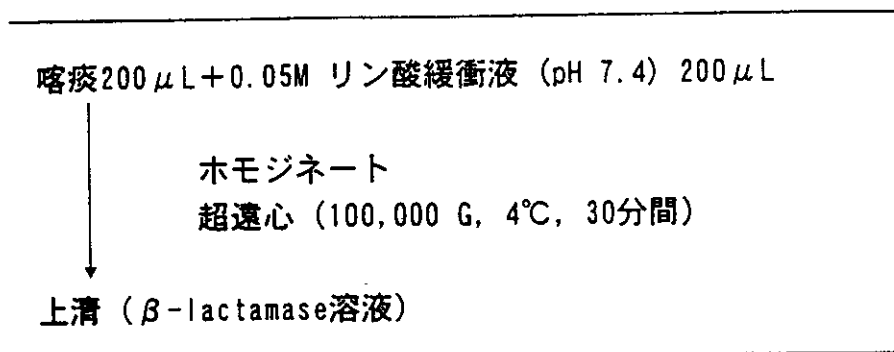


図2 菌株からのβ-ラクタマーゼの調製方法

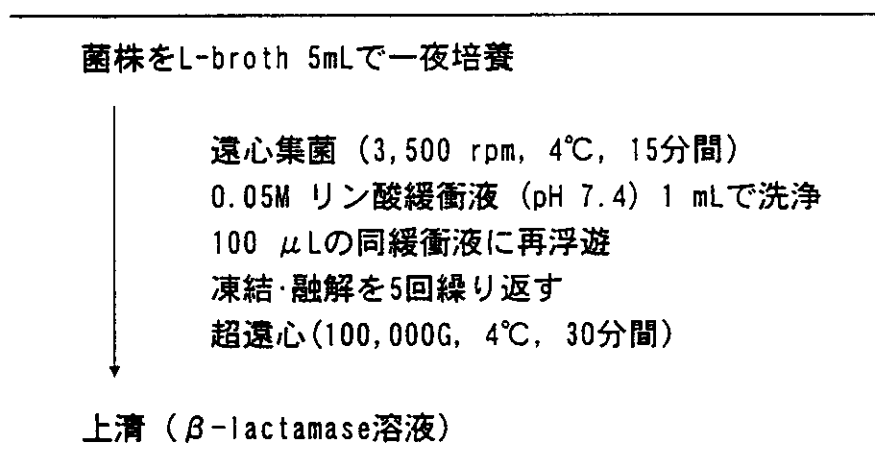


表1 β-ラクタマーゼ活性測定の方法および条件

使用基質	ニトロセフィン
基質濃度	10, 25, 100 μM
測定波長	482 nm
測定装置	自記吸光光度計 (Beckman DU640)
反応時間	1 分間
反応温度	37 °C

図3 *Pseudomonas aeruginosa*と*Enterococcus faecalis*が検出された喀痰からの抽出液を100 μ M ニトロセフィン溶液に反応させた場合の経時的吸光度変化

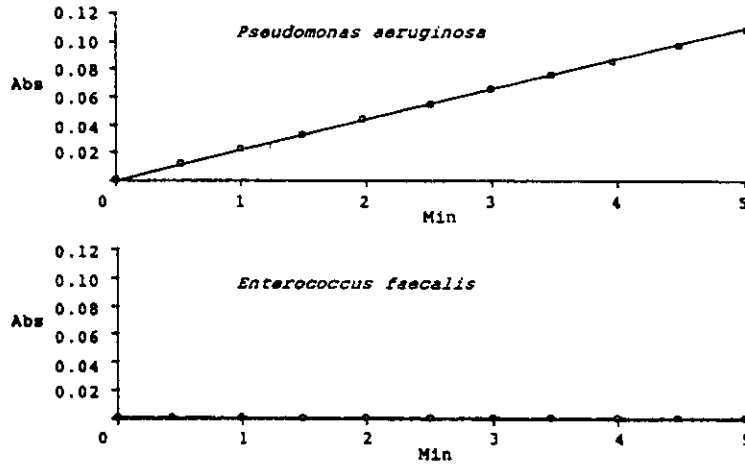


表2 喀痰中 β -ラクタマーゼの酵素学的パラメーター

検体	菌数 (CFU/mL)	V_{max} (μ M/sec)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m
A	10^5	0.132	37.3	0.0035
B	10^7	0.014	23.1	0.0006
C	10^7	0.071	39.2	0.0018
D	10^7	0.093	37.6	0.0025
E	10^6	0.165	33.7	0.0049
F	10^7	0.023	25.2	0.0009
G	10^6	0.059	24.1	0.0024
H	10^5	0.059	22.3	0.0026
I	10^6	0.011	17.4	0.0006
N	10^7	0.005	127.5	<0.0001

図4 酵素学的パラメーター算出時に行った各種プロット

