

Class
 Wild type or prototype
 Mutation of one nucleotide
 Mutation of three nucleotides

3) *vanA* probeを用いたVRE plasmid DNAのSouthern hybridizationとVRE DNAのPCR法による *van*遺伝子解析。図2のplasmid DNAの *EcoRI*断片のagarose gel electrophoresisを *vanA*probeを用いてsouthern hybridizationを行った(図3)。*vanA* probeはそれぞれ

図2
 Agarose Gel Electrophoresis of *EcoRI* Fragments of VRE Plasmid DNA

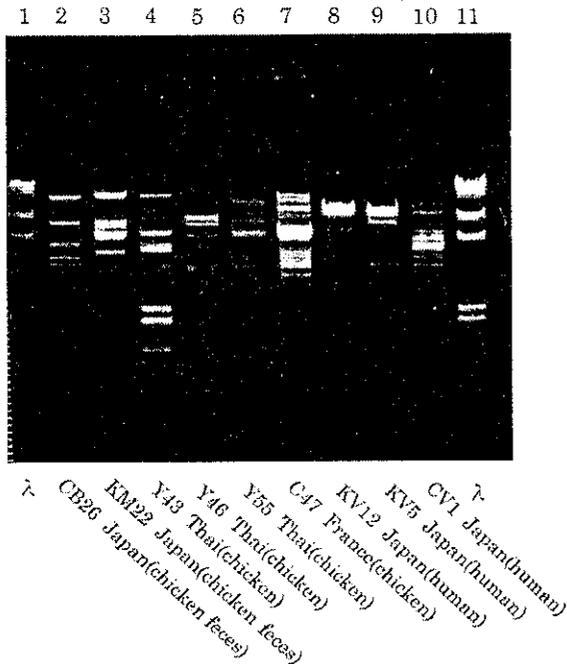
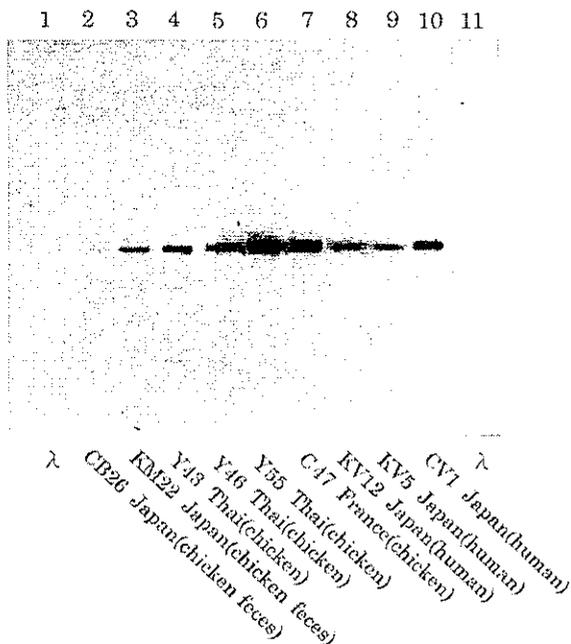
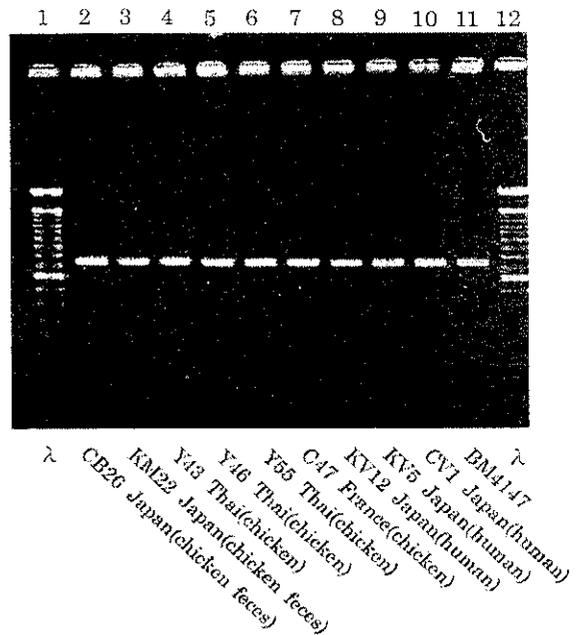


図3
 Southern hybridization of *EcoRI* fragment of VRE plasmid DNA with *vanA* probe



れのplasmid DNAの4.1kbの *EcoRI*断片に相補結合を行った。この結果はVREのvancomycin耐性遺伝子がplasmid DNA上に存在することを示している。*vanA*, *vanB*, *vanC*に特異的なprimer DNAを用いて解析した結果を図4に示す。増幅されたDNAは*vanA* primerによる0.732kb DNA断片である。この結果からも調べたVREが*vanA*型であることが解った。

図4 PCR of VRE with *vanA* primer



4) VanA型遺伝子の *vanS* 遺伝子解析

日本で分離されたvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性VREのすべてについて *vanS* 遺伝子の塩基配列を調べた(表1)。*vancomycin*高度耐性、teicoplanin低感受性VREのVanA型遺伝子と野生型VanA型遺伝子は *vanS* 遺伝子の塩基配列が異なっていた。*vancomycin*高度耐性teicoplanin低感受性VREはすべて *vanS* 遺伝子の1152塩基の148、160、207番の塩基が野生型から変異していることが解った。

D. 考察

1996年以来日本では、4地域8人の患者からVREが分離されている。これらはすべてVanA型VREであった。そのうち2地域5人の患者から分離されたVRE5株はvancomycin高度耐性、teicoplanin高度耐性の野生型(代表的)VanA VREであった。残りの2地域3人の患者から分離された

VRE 3株はすべて vancomycin 高度耐性 teicoplanin 低感受性株であった。ヨーロッパ、アメリカ合衆国等の臨床分離株は一般に vancomycin-teicoplanin 高度耐性の野生型 VanA VRE である。輸入鶏肉の VRE の調査では、France 鶏肉の約 30%、Thai 鶏肉の約 20% から VRE が分離されている。フランス鶏肉からは高頻度に VRE が分離されるが、その薬剤耐性は vancomycin-teicoplanin 高度耐性の野生型 VanA VRE であった。一般的な野生型 VanA VRE の場合、鶏肉 VRE の Van 遺伝子と人 VRE の Van 遺伝子構造が一般に同一の野生型であるためにその特徴を論ずることができない。そのため野生型 VanA VRE の場合 VRE の由来を van 遺伝子から論ずることは困難である。今回たまたま遺伝子解析を行ったフランス鶏肉 VanA VRE *E. faecalis* C47 は van S に 1ヶ所変異が存在したがその変異は teicoplanin 耐性に影響を与える変異ではなかった。

人由来の vancomycin 高度耐性 teicoplanin 低感受性 VRE 3株及び Thai 輸入鶏肉から分離された vancomycin 高度耐性 teicoplanin 低感受性 VRE 3株を vancomycin と teicoplanin 両薬剤を含む寒天培地で耐性検査を行った時、vancomycin の濃度に比例して、teicoplanin 耐性値が上昇することから VanA 型 vancomycin 耐性遺伝子の van S 遺伝子の変異が推測された。塩基配列を調べた結果、これらの株の van S 遺伝子の塩基配列は 3ヶ所の塩基が野生型 van S と異なっていた。そして、その変異はすべて同じ部位であった。遺伝子において同じ部位 3ヶ所に独立に変異がおきる確率は一般的には非常に小さい。日本の 2地域 3人から分離された VRE と Thai 鶏肉から分離された VRE の VanA 遺伝子の van S の同じ 3ヶ所に野生型と異なる変異が存在することは、これらの人の VRE の VanA 型遺伝子と Thai 鶏肉から分離される VRE の VanA 型遺伝子が共通の遺伝子に由来することを示唆する。今回の研究では人由来 VRE と、Thai 鶏肉由来 VRE の van S 遺伝子に、独立には起き難い同じ 3ヶ所に変異が存在していたことから人、鶏肉由来 VRE の van 遺伝子のお互いの関連性が明らかになった。この結果はこのような特徴的な van 遺伝子のみならず一般に鶏肉 VRE と人 VRE の van 遺伝子の関連性を示唆するものである。

日本の鶏肉輸入量は年間約 60 万トンである。一

方国内生産量は 120 万トンである。60 万トンの輸入量のうちタイからの輸入量は約 10 万トンである。タイ産鶏肉の 20% から VRE が分離される。フランス産鶏肉の年間輸入量は約 2300 トンである。フランス産鶏肉の約 30% から VRE が分離される。ヨーロッパにおいて家畜や家禽類の VRE と人の VRE との関連性が推測されている多くの報告がある。これまでの報告では動物由来の VRE と人由来の VRE の菌株の同一性は証明されていない。多くの報告は家禽生産者、食肉取扱者から VRE が高頻度に分離されることにより人の VRE が家畜から由来することが推測されているものである。その中で細菌学的に証明されているのは ribosome RNA 型 (ribotyping) の同一性によるものである。又最近、肉を多く食べる人は菜食主義者よりその便に VRE が多く分離されることが報告されている。これらの報告から我々の今回の研究の結果は、現在までに日本において臨床から VRE の分離は少ないが日本人のある人々の便の中に鶏肉を介して鶏の VRE が既にコロナイゼーション (細菌叢を形成) している可能性が推測される。

E. 結論

- 1) 日本人 8 人の患者分離 VRE のうち 2 地域 3 人から分離された VRE は vancomycin 高度耐性 teicoplanin 低感受性で、VanA 型 VRE であった。
- 2) 輸入鶏肉分離 VRE のうちタイ産鶏肉 VRE 3 株は vancomycin 高度耐性、teicoplanin 低感受性で VanA 型 VRE であった。
- 3) 人から分離された 3 株とタイ産鶏肉 VRE 3 株の vancomycin 高度耐性、teicoplanin 低感受性 VanA 型 VRE の van S 遺伝子の塩基配列はすべての株において、野生型の van S 遺伝子の塩基配列のなかで同じ 3ヶ所に変異があった。

F. 研究発表

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^r) (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

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）

アミノグリコシド耐性菌の耐性機構の解析と迅速検出に関する研究

分担研究者 堀田 国元 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

臨床分離されたArbekacin (ABK) 耐性MRSA株の耐性因子とその迅速検出法を研究した。

まず(平成9年度)、ABK耐性MRSA菌株等のABK耐性因子を特定する簡便な方法を研究し、アミノグリコシド(AG)多剤耐性パターンによる不活化酵素[AAC(6')/APH(2'')またはAAC(6')]推定法、粗酵素によるAG変換物の簡便検出法およびキー耐性遺伝子のPCR検出法を確立した。

平成10年度は、ABK耐性MRSAとして臨床分離された菌株のAG耐性、菌学的性状および抽出DNAを用いてPCRによる *mecA*とAAC(6')/APH(2'')の存否を調べた。その結果、これらはABK感受性菌や非MRSA菌株を含み、ABK耐性MRSA株はすべて *mecA*とAAC(6')/APH(2'')を保持することを認め、PCR解析がABK耐性MRSAの同定精度を高める上で必要かつ有用なことを指摘した。

平成11年度は、PCRの簡便迅速化を目指して、抽出したDNAを鋳型として用いないPCR法を検討し、ごく少量の細胞をコロニーから反応液に直接添加し、そのままPCRすることによって再現性よく選択的に標的遺伝子を増幅できる簡便迅速なコロニーPCR法を確立した。

協力研究者

石川 淳

国立感染症研究所生物活性物質部・厚生技官
吉良清子

国立感染症研究所生物活性物質部・厚生技官
近藤信一

(財)微生物化学研究所・部長

2. 耐性試験

AGを所定濃度に添加した栄養寒天培地(栄研; 0.5%食塩含有)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 μ l(約10⁵cfu)を点滴接種し、37 $^{\circ}$ Cで24~48時間培養後のコロニー生育を観察判定した。

3. 粗酵素液の調製

ABK添加(5 μ g/ml)普通ブイヨン(栄研)で37 $^{\circ}$ C 24時間振盪培養し、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で2度洗浄した菌体を超音波破碎し遠沈した上清を粗酵素とした。放線菌#8株からのクローン化耐性遺伝子をもつ *Streptomyces lividans* TK21/S2は、ABK(5 μ g/ml)添加 Tryptic Soy Brothで27 $^{\circ}$ C 3日間振盪培養した菌体を0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.0)で2度洗浄後、酸化アルミナで破碎し、遠沈した上清を粗酵素液とした。

4. アミノグリコシド(AG)修飾試験

AG 0.5mM, ATP \cdot 2Na 2.5mM, AcetylCoA 2.5mM, リン酸緩衝液 0.1M(pH7.0)に粗酵素液 20% (v/v)を添加して37 $^{\circ}$ Cで反応(液量50 μ l)を行った。反応産物は、反応液2 μ lをTLCプレートにスポットし、5%KH₂PO₄によって展開後、ニンヒドリン反応でモニターした。

5. AG修飾物の構造解析

上記の修飾反応を10ml規模で行った後、反応液をAmberlite CG50(NH₄)カラムクロマトグラフィにより生成し、MassおよびNMR解析を行った。

6. 菌学的性状試験

ABK耐性MRSAとして臨床分離された菌株を対象に

A. 研究目的

アミノグリコシド抗生物質(AG)は、グラム陽性菌や緑膿菌を含むグラム陰性菌、さらに結核菌に対して臨床使用されているが、中でも半合成AGであるAmikacin(AMK)、Isepamicin(ISP)、抗MRSA剤のArbekacin(ABK)が多用されている。これらのAGに対する耐性菌は、ほとんどが修飾不活化酵素に依存するものであるが、これらのAGの改変部位の特徴からこれらを修飾できる酵素は二機能酵素のAAC(6')/APH(2'')やAAC(6')などに限られている(図1)。特にABKの場合は前者をもつ中等度耐性菌が低頻度に報告されているだけであった。しかし最近、高度ABK耐性のMRSAや緑膿菌が報告され、臨床において問題となっている。そこで、本プロジェクトではABK耐性MRSA菌株の耐性機構の解析とキー耐性遺伝子である *mecA*とAAC(6')/APH(2'')の迅速検出法の確立を目指した。

B. 研究方法

1. 使用菌株

ABK耐性の *Staphylococcus aureus* AR19(MRSA)、平成10年に全国各地の医療施設においてMRSAとして分離された43株、 *Pseudomonas aeruginosa* AR2株(臨床分離株)および放線菌#8株を用いた。

血液寒天、S F培地およびE F培地での生育、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。

7. PCR鋳型DNAの調製

普通ブイヨンで37°C一晩培養したABK耐性株の菌体をTE[10mM Tris-HCl(pH8.0)-10mM EDTA(pH8.0)]で洗浄後、リゾチーム(1mg/ml)、リゾスタフィン(10 μ g/ml)を加え、37°Cで30分インキュベート後、SDSで溶菌し、RNaseとProteinase K(終濃度10及び100 μ g/ml)を加えて50°C30分インキュベートした後、フェノール/クロロホルム(1:1)処理に続いてエタノール沈殿・洗浄し、乾燥後TEに溶解したものをDNA溶液とした。

8. PCRプライマー

AG修飾酵素遺伝子のデータベース検索とアラインメント解析を行って、二機能酵素 AAC(6')/APH(2'')遺伝子用のプライマー(図2)として4種の配列を設計した(P1, P2, P2c, P3)。一方、*mecA*遺伝子検出用に、*mec1*と*mec2*を設計した。

9. PCR反応

Taq polymeraseを用いるPCRの反応液(20 μ l)の組成は、DNA 5 μ l、各プライマー 0.5 μ M、dNTP 0.2mM、Taqポリメラーゼ 1.25単位である。PCRは、95°C、3分→(95°C、30秒→72°C、3分→50°C、30秒)×25回→72°C、60秒の条件で行った。

コロニーPCRにはKOD-Plus-polymeraseを用いた。そのPCR反応液(20 μ l)は、1xPCR buffer, dNTP各0.2mM, MgSO₄・H₂O 1mM, KOD-plus- DNA polymerase(TOYOBO) 0.4U, 各プライマー 0.5 μ M, 鋳型(DNAと菌体熱水抽出液の場合 5 μ l、またはコロニー菌体)を基本組成とした。PCR条件は 95°C・3分→(95°C・30秒→50°C・30秒→72°C・60秒)×30サイクルを設定した。

PCR産物の検出は、反応終了後 アガロース電気泳動により行った。

(倫理面への配慮)

臨床由来のMRSAを使用するので、実験はすべてP2レベルの実験室で実施した。

C. 研究結果

1. ABK耐性MRSAの耐性機構の解明と耐性因子迅速検出のための基礎的検討

まず(平成9年度)、ABK耐性の*S. aureus* AR19株(MRSA)や*Pseudomonas aureus* AR2株を用いて基礎的研究を行った。

1-1. アミノグリコシド耐性

まず、ABK耐性MRSAのAR19を用いた試験の結果、この株は食塩含有普通寒天培地では試験したAGす

べてに200 μ g/mlの耐性を示したが、食塩を含まない培地では、AMKに対して50 μ l/ml、ABKとISPに対して25 μ g/mlと低い耐性しか示さなかった。

このAG耐性がもし不活化酵素によるとすれば、関与する酵素は次のように考えられた。まず、2'-NH₂がないKMに耐性なのでAAC(2')ではなく、3'と4'にOHがないDKB(Dibekacin)に耐性なのでAAD(4')やAPH(3')は否定される。また、AMKに耐性なのでAAC(3)ではない。残る可能性はAAC(6')/APH(2'')かAAC(6')に絞られる。

一方、*P. aeruginosa* AR2株は食塩非含有培地(ISP No. 2)でもすべてのAGに耐性を示した。従ってAR19株とは異なる耐性機構を持つと判断された。

放線菌 #8株は、ABKをはじめ各種のAGに耐性を示したが、6'-OHを欠くParomomycinに特異的に感受性であったので、AAC(6')の関与が示唆された。

1-2. 粗酵素によるAGの変換

S. aureus AR19の粗酵素(CFE)によるATPおよびacetylCoA存在下でのAGの変換をTLCによってモニターした結果(図3)、DKBとAMKが完全変換されてもABKとISPの変換は部分的であった。すなわち、DKBやAMKに比べてABKとISPは、修飾速度が顕著に遅く、耐性レベルが低いという相関が認められた。

P. aeruginosa AR2ではDKBとABKで部分的修飾がおきたが、AMKとISPでは認められなく、修飾能と耐性の間には相関性がなかった。

放線菌#8由来のクローン化アセチル化酵素による修飾試験では、DKB、ABK、KM、AMKで変換が認められた。構造解析した結果、AMKもABKも6'-NH₂がアセチル化されていた。従って、クローン化遺伝子はAAC(6')をコードすると結論された。

以上のTLCの展開液として5%KH₂PO₄を用いたが、基質のAGとアセチル化物および反応液中のタンパクやアミノ酸との分離が良好で、粗酵素によるAG変換のモニターに有効であった。

2. 各地の医療施設で分離されたABK耐性菌の解析

上記の成果を踏まえて、平成10年度は全国各地の医療機関においてABK耐性MRSAとして分離同定された菌株を対象に研究を行った。

2-1. 菌学的性状

MRSA株として臨床分離された43菌株の菌学的性状を試験した結果、そのうちの10株は、血液寒天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、S F培地とE F培地で発育した。カタラーゼとコアグララーゼはマイナスであった。以上から、これらは腸球菌(*Enterococcus*)と判定され、うち9株は*E. faecalis*、1株は*E. faecium*と同定した。他の33株は*S. aureus*の菌学的性状を示した。

2-2. アミノグリコシド耐性

表1に食塩含有培地(NA)と非含有培地(No. 2)で行ったABK耐性試験の結果を臨床から報告されたABK耐性と比較して示した。腸球菌と同定された10菌株を除いて両者に高い相関性は認められなかった。*S. aureus*と確認された33株にはABK高度耐性(100 μg/ml)が普通寒天培地で2株認められたが、これらも食塩非含有のISP No. 2寒天培地では5 μg/ml耐性しか示さなかった。

表には示さないが、各種のAGに対する耐性を調べた結果、2、3の例外を除いてABKに対する耐性レベルがもっとも低いことが認められた。

3. PCRによる耐性遺伝子の迅速検出

3-1. DNAを鋳型とするPCRによる検出

これまでに臨床で分離されたABK耐性MRSAは二機能酵素 AAC(6')/APH(2'') によっている。この酵素は、*Streptococcus(Enterococcus) faecalis*からも報告され、塩基配列は1塩基だけしか違わない。従って、この酵素の遺伝子をPCRで迅速かつ選択的に検出することが重要と考えられた。

そこで(平成9年度)、AR19株(MRSA)とAR2株(緑膿菌)から調製したDNAを鋳型としてPCRを試みた(図4)。その結果、増幅断片はAR19のDNAを鋳型としたときのみ検出され、緑膿菌のDNAからは認めなかった。続いて平成10年度は、aac(6')/aph(2'')とmecAの同時検出を検討した。その結果(図4)、各々の遺伝子に対応するプライマーの単独使用でそれぞれ明瞭な増幅バンドが検出された(①~④)。一方、両遺伝子のプライマーをmulti-plexで用いた場合(⑤~⑦)も設計通り2本のバンドが認められたが、⑤の組み合わせ(mec1, mec2, P1及びP2c)が最良の結果を与えた。

そこで、⑤の組み合わせのプライマーを添加し、ABK耐性菌43株から調製したDNAを鋳型としてPCRを行った結果(図5)、両遺伝子が検出される、mecAだけ検出される、aac(6')/aph(2'')だけ検出

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。

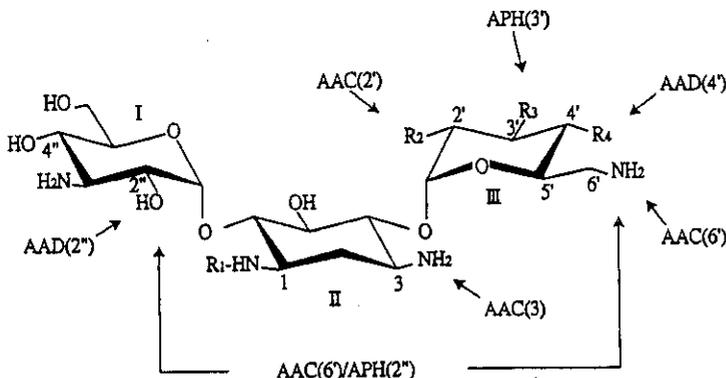
表2に各菌株の結果をABK耐性試験の結果とともに示した。MRSAにおいてはいずれの場合もmecAが検出されたが、aac(6')/aph(2'')が認められたのは23株で、10株では検出されなかった。この10株はいずれもABK感受性であった。この結果、aac(6')/aph(2'') 遺伝子の存否とABK耐性レベルの間に明瞭な相関が認められることがわかった。

一方、再同定試験により腸球菌と同定された10菌株では、いずれもmecAが検出されず、5株においてaac(6')/aph(2'')が検出された。

3-2. コロニーPCRによる耐性遺伝子の検出

臨床においてPCRを導入するには、DNA調製を必要としていては難しい。そこで、MRSAおよび腸球菌の遺伝子の検出をより迅速、簡便に行なう新たな方法としてDNA抽出操作無しにコロニーから菌体を直接反応液に添加するコロニーPCR法を検討した。具体的には、寒天平板上のコロニーに滅菌爪楊枝の先を僅かに接触し、それをPCR反応液(KOD-Plus-DNA polymeraseとmulti-plexプライマー含有)にタッチ(またはマイクロチューブの底にタッチしてから反応液を添加)し、PCRを行なった。その結果、ABK耐性のMRSや腸球菌におけるmecAとaac(6')/aph(2'')の有無を容易かつ迅速に検出できた。図6は、これらの遺伝子の存否がすでにより明らかになっている33株のMRSAおよび10株の腸球菌の計43株を対象にコロニーPCRを行なった結果の一部を示している。

このコロニーPCRが再現性の良い結果を与えるためには、以下の点が重要であることがわかった。コロニーから爪楊枝の先端に付着する菌数をできるだけ少なくすること(10³~10⁴cfuが好適)、高性能のDNA Polymerase (TaqよりもKOD-plusが良い)を使用することによって再現性の良い結果が得られることを見出した。



抗生物質	部分構造				修飾(不活化)酵素				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	AAC	APH	AAD	AAC6'/APH2''	
KM	H	OH	OH	OH	○	—	○	○	○
DKB	H	NH ₂	H	H	○	○	—	—	○
AMK	AHB	OH	OH	OH	×	△	○	○	△
ABK	AHB	NH ₂	H	H	×	×	△	—	△

AHB: NH₂CH₂CH₂(OH)CHCO-
○修飾される、△修飾されにくい、—修飾部位なし

図1. アミノグリコシド(KM系)抗生物質の構造と修飾酵素標的部

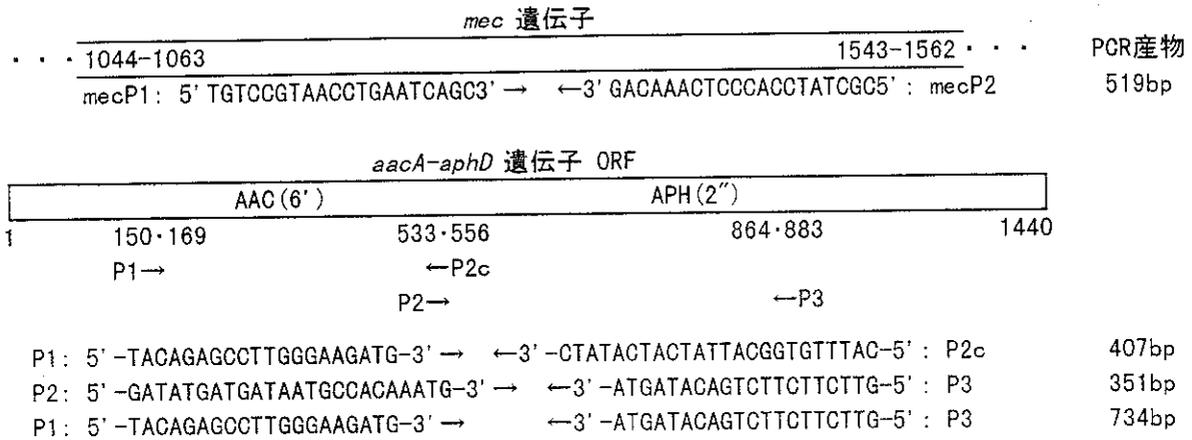


図2. *mec*およびAAC(6')/APH(2'')遺伝子のPCR用プライマーと予想PCR産物

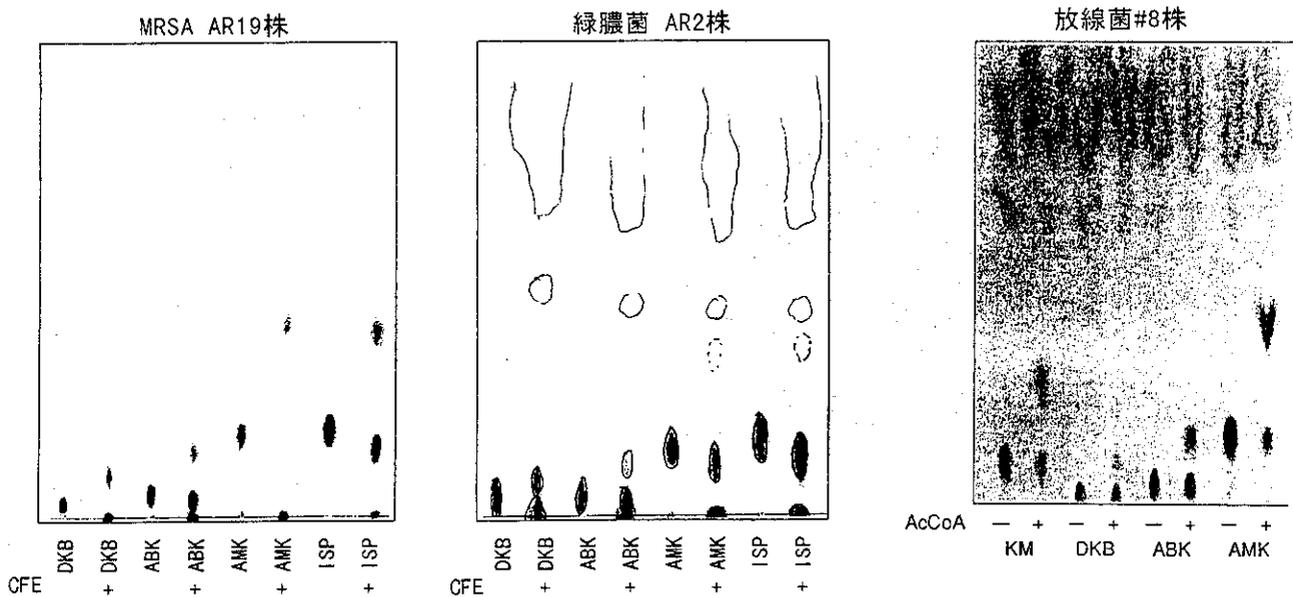


図3. 粗酵素 (CFE) によるアミノグリコシド抗生物質の変換

表1. 臨床分離株のABK耐性に対する試験培地の影響

	臨床耐性情報 レベル	菌数	普通寒天培地				ISP No. 2寒天培地			
			<5	5	25	100	<5	5	25	100
MRSA 33株	≥128	13	1	5	5	2	5	8	0	0
	64	2	0	2	0	0	2	0	0	0
	32	2	0	2	0	0	2	0	0	0
	2~8	16	13	3	0	0	15	1	0	0
腸球菌 10株	≥128	10	0	0	5	5	2	8	0	0

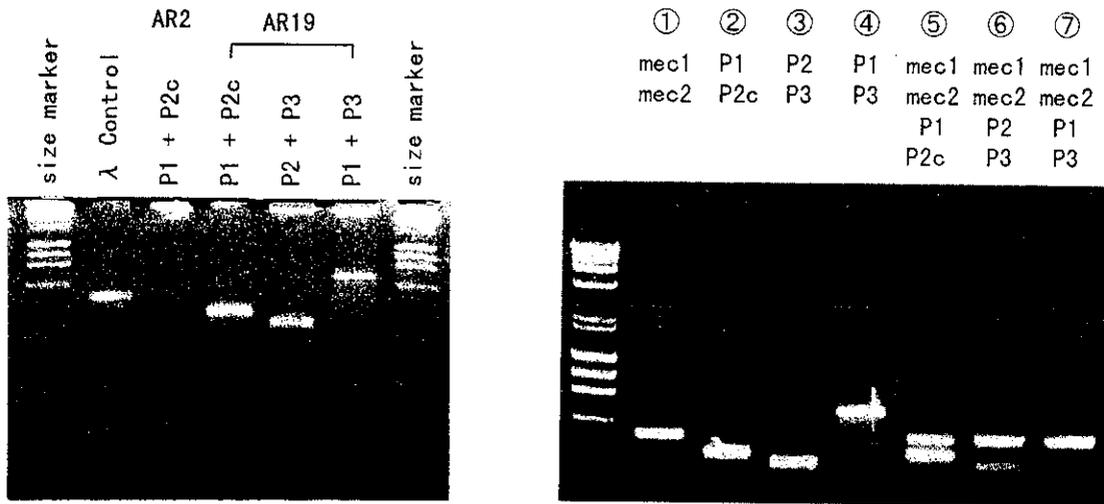
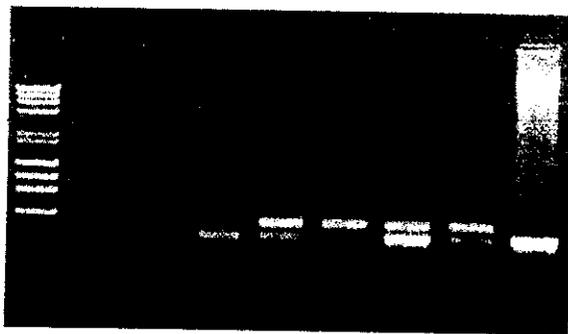


図4. PCRによる *mecA* と *aac(6')/aph(2'')* 遺伝子検出のためのプライマーの組み合わせの検討



mecA: - - - + + + + -
aac(6')/aph(2''): - - + + - + + +

図5. DNA鋳型PCRによる *mecA* と *aac(6')/aph(2'')* の検出

表2. 臨床分離株の耐性遺伝子とABK耐性

同定菌種	<i>mecA</i>	<i>aac/aph</i>	株数	ABK耐性度*
<i>S. aureus</i>	+	+	21	≤ 25
<i>S. aureus</i>	+	+	2	100
<i>S. aureus</i>	+	-	10	< 5
<i>E. faecalis</i>	-	+	5	25 ~ >100
<i>E. faecalis</i>	-	-	4	25 ~ >100
<i>E. faecium</i>	-	-	1	>100

* ABK含有普通寒天培地（食塩0.5%）における耐性度

lane: 1 2 3 4 5 6 7 8 9
mecA: + + + + + - - - +
aac(6')/aph(2''): - + + - - + - - +

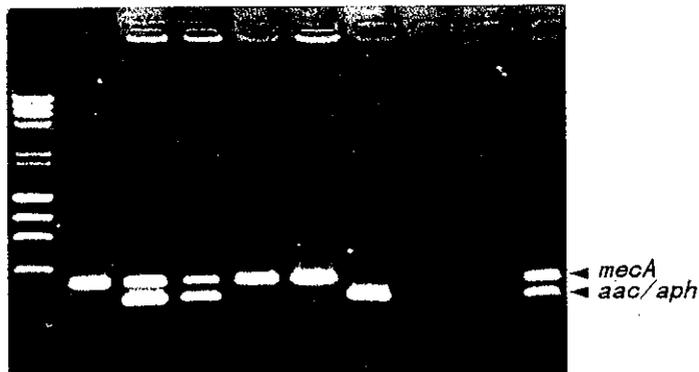


図6. コロニーPCRによるMRSAと腸球菌の耐性遺伝子の検出

D. 考察

臨床AG耐性菌の耐性因子は、通常、AG修飾酵素であり、一般的にその基質特異性によるAG多剤耐性を示す。従って、あるAG耐性菌として分離された菌株のAG多剤耐性パターンによって、関与する修飾酵素が推定可能である。本研究で供試したABK耐性MRSAも耐性試験結果から AAC(6')/APH(2'')か AAC(6')の関与が推定され、PCRの結果から前者の関与と判断された。

PCRによる遺伝子解析は迅速検出に有効であるが、酵素活性をチェックすることも重要である。その意味で、本研究で用いたTLC系は粗酵素に由来するアミノ酸やタンパクなどが共存してもAGとその変換物を明瞭に検出することができ、酵素活性のチェックに有用と思われる。

一方、MRSAとして臨床分離された43菌株のABK耐性に関しては、再確認試験において臨床情報と著しく異なる結果となった。菌学的再同定試験とPCR解析の結果、*S. aureus*と再同定できたのは33株で、それらには*mecA*を確認できたが、AAC(6')/APH(2'')遺伝子が検出できない菌株が10株認められ、その10株はいずれもABK感受性であった。すなわち、AAC(6')/APH(2'')の存否とABK耐性の間には明確な相関性が認められた。一方、菌学的に腸球菌と同定された菌株が10株あり、それらからは*mecA*が検出されなかった。以上のことから、*mecA*と*aac(6')/aph(2'')*の存否をチェックすることはABK耐性のMRSAの同定精度を高める上で必要かつ有用と判断された。

PCRに関しては、MRSAや腸球菌においても鋳型DNAの調製を必要としないコロニーPCRが再現性よく成立する条件を見出すことができた。これは、多数の検体をこなす必要がある臨床現場においても十分使える技術として有用と思われる。

E. 結論

1. ABK耐性の臨床由来のMRSAと緑膿菌のABK耐性要因を研究し、MRSAではAAC(6')/APH(2'')、緑膿菌では未同定のAACの存在を確認した。
2. 各地の医療機関においてABK耐性MRSAとして分離された菌株には、非ABK耐性株や非MRSAが含まれており、同定精度の向上が必要である。
3. ABK耐性MRSAの鍵遺伝子であるAAC(6')/APH(2'')と*mecA*のPCRによる迅速検出条件を確立した。特に、菌体からの鋳型DNAの調製無しに、寒天培地のコロニーからごく少量の菌体を直接反応液に添加してPCRを行い、再現性よく両遺伝子を増幅できるコロニーPCRを確立した。
4. 確立したコロニーPCRは、検体の多い臨床現場においても十分に使える技術と判断される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kondo S. and Hotta K.: Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications. *J. Infect. Chemother.* 5: 1-9 (1999).
- 2) 堀田国元、石川淳、石井亮一、斎藤文子、吉良清子、荒川宜親、池康嘉: アルベカシン耐性MRSAの判定における問題点とPCR検定の必要性と有用性. *Jap. J. Antibiotics* 52: 525-532 (1999).
- 3) Zhu C. B., Sunada A., Ishikawa J., Ikeda Y., Kondo S. and Hotta K.: Role of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase in a novel multiple aminoglycoside resistance of an actinomycete strain #8: Inactivation of aminoglycoside with 6'-amino group except arbekacin and neomycin. *J. Antibiot.* 52: 889-894 (1999).
- 4) 土崎尚史、石川淳、堀田国元: コロニーPCRによるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出. *Jap. J. Antibiotics*, 投稿中.

2. 学会発表

- 1) 砂田亜津子、石川淳、朱春宝、水野左敏、堀田国元: アルベカシン耐性放線菌由来のアミノグリコシドアセチル化酵素遺伝子の解析. 平成9年度日本放線菌学会大会, 長崎, 平成9年5月.
- 2) 堀田国元、池田洋子、近藤信一: 2種類のAAC遺伝子の複合作用に対するアルベカシンの抵抗性. 第47回日本化学療法学会総会、東京、1999年6月.
- 3) 石川淳、吉良清子、石井亮一、堀田国元: アルベカシン耐性臨床分離株の耐性遺伝子のPCR解析. 第81回日本細菌学会関東支部総会、東京、1999年6月30日.
- 4) Sunada A., Ishikawa J., Zhu C. B., Kondo S. and Hotta K.: Novel aminoglycoside acetyltransferase activities of a rare actinomycete strain #8 with novel aminoglycoside resistance profile. 10th Intl. Symp. on Biology of Actinomycetes, Greece, Oct. 26, 1999.
- 5) 堀田国元: コロニーPCRによるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出. 第73回日本細菌学会総会、札幌、2000年5月.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 渡邊邦友 岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設 教授

要旨

IS elementの上流部分とIS elementの直下流にあり、メタロ-β-ラクタメースをコードしている*cfiA*遺伝子の5'末端部分の間を増幅するプライマーGとEによるPCRを行ったところ、メタロ-β-ラクタメースを産生し、イミペネムに耐性（MIC、 $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ）な*Bacteroides fragilis*のみが約2.0 kbpのPCR産物を産生し、*cfiA*を保有していてもイミペネム感性的な*B. fragilis*は約400bpの増幅産物しか得られず、また*cfiA*陰性の株ではPCRにより産物は得られなかった。塩基配列の解析結果から、今回使用したイミペネム耐性*B. fragilis*6株からは、今までに報告のない新規のIS-like elementが5種類見出された。これらのIS-like elementと*cfiA*をPCR法で検出し、*B. fragilis*株中における分布を調べ、これらの遺伝子の両方あるいは一方を保有する株のone-step mutationによる耐性化実験を行ったところ、9株全てで耐性化は認められなかった。以上の結果から、プライマーGとEを用いたPCRはイミペネム耐性*B. fragilis*の迅速検出に有用であると思われる。また、イミペネム耐性*B. fragilis*の株数が臨床の場で急速に増加することを示唆する所見は、in vitroの実験からは得られなかった。

研究協力者

加藤直樹
岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設
助教授
山添喜久雄
岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設
研究生

天培地（極東）を用いた寒天平板希釈法で行った。メタロ-β-ラクタメースはUV法とバイオアッセイの2つの方法で測定した。

IS-like elementの塩基配列決定は*cfiA*を有し、メタロ-β-ラクタメース産生性の6株について行った。*cfiA*の直上流にあるISは、Podglajenら（1994）が報告しているISの直上流に位置する塩基配列から選んだforward primer G（5'-CGCCAAGCTTTGCCTGCC-ATTAT-3'）と*cfiA*の5'末端近傍を含むreverse primer E（5'-CTTCGAATTCGGCGAGGGATACATAA-3'）を用いてPCRで検出し、IS-like elementの塩基配列は得られたPCR産物約2-kbpを直接解析することにより決定した。

5種類の菌株から検出されたIS-like elementをPCRで検出する際には、以下のプライマーセットを使用した。すなわち、IS-like element no.1 (GAI 30079由来), no.13 (GAI 92082由来), no.19 (GAI 92684由来), no.22 (GAI 92087由来), no.257 (GAI 20464由来)の検出にはそれぞれ順にプライマーGIS1-5/GIS1-6, GIS1-3/GIS13-4, GIS1-3/GIS19-4, GIS217-3/GIS217-2, GIS257-1/GIS257-2を使用し、それぞれの増幅産物の大きさは、402bp, 242bp, 228bp, 446bp, 553bpである。PCRの条件はすべて、95°C 20秒、66°C 2分を35回繰り返して行い、PCR産物の検出は5%ポリアクリクアミドゲルを用いた電気泳動後のエチジウムブロマイド染色で行った。

*cfiA*遺伝子の検出は、プライマーGAF-1（5'-CCCAACTCTCGGACAAAGTG-3'）とGAF-4（5'-

A. 目的

*Bacteroides fragilis*は嫌気性菌感染症から最も多く検出される菌種であり、多くの薬剤に耐性の菌株が認められる。カルバペネムは現在、広範囲な嫌気性菌に抗菌力を有し、その使用は切り札的なものと言える。このようなカルバペネムに耐性の嫌気性菌を多発させることは感染症の治療上大きな問題であり、カルバペネム耐性菌を迅速、簡便に検査する方法を確立することは耐性菌のモニタリングや治療上、極めて重要なことと思われる。本研究の目的は、*B. fragilis*に見られるメタロ-β-ラクタメース産生株を、PCR検査法により迅速、簡便に検出することにより、イミペネムをはじめとするカルバペネム耐性*B. fragilis*による感染症を的確に検査し、このことを通じて、カルバペネム耐性菌の出現を最小限度に抑えられるようにすることである。

B. 材料と方法

菌株は当施設保有の*B. fragilis*を使用した。MICは米国のNCCLSの測定法に従い、ブルセラHK血液寒

ACGATCTGCTTGGTATGCTC-3')を用いて行った。PCRは95°C 20秒と64°C 2分を35回繰り返し行った。PCR産物の検出は上記の方法で行った。

One-step mutationは、イミペネム16 μ g/mlを含む変法GAM寒天培地にイミペネム感性株を嫌気培養することにより行った。この寒天培地に出現した微細なコロニーは、1回継代後、寒天平板希釈法でイミペネムに対するMICを測定した。

C. 結果と考察

イミペネムのMICが16~>256 μ g/mlでメタロ- β -ラクタメース産生性の6株ではプライマーG/Eを用いたPCRで約2-kbpの増幅産物が得られた (Table 1)。また、*cfiA*を保有するがメタロ- β -ラクタメースを産生しないintermediateの感受性を示す2株と感性9株ではIS-like elementが存在しないことを意味する約0.4-kbpのPCR産物しか得られなかった (Table 1)。*cfiA*を持たないイミペネム感性147株ではPCR産物は得られなかった (Table 1)。

以上の結果は、メタロ- β -ラクタメースを産生し、イミペネムに耐性の株は必ず*cfiA*遺伝子を持ち、その直上流にはIS-like elementが存在することを意味するPCRが陽性であり (プライマーG/Eで約2.0-kbpの増幅産物が得られる)、*cfiA*遺伝子を有するがイミペネムに感性的株は*cfiA*の直上流にIS-like elementは存在しないことを示す。

ついで*cfiA*遺伝子の発現制御に関与していると思われるIS-like elementの塩基配列を、イミペネムのMIC値が $\geq 16 \mu$ g/mlの6株において決定した。*cfiA*遺伝子部分を除いた、IS-like elementの大きさは1767~1780ヌクレオチドで、ほとんど同じ長さであった。

6株から検出されたIS-like elementの内、no.1 (GAI 30079由来)とno.217 (GAI 20436由来)が100%のヌクレオチド相似性を示したが、その他のIS-like elementでは46.3~85.5%のヌクレオチド相同性にとどまった。また、既に報告されているIS elementとの比較では、50%以上の相同性を示すものはなく、このことは、今回検討した6株から今までに報告のない新しいIS-like elementが5種類検出されたことを示唆するものと思われた。

今回塩基配列が決定されたIS-like elementが日本で分離された*B. fragilis*株の間でどの程度存在するかを検討するため、それぞれのIS-like elementに特異的なPCRを行った。

我々はさらに、イミペネム感性的*B. fragilis*128株における*cfiA*遺伝子と今回見出した5種類のIS-like elementの分布を検討した。5種類のIS-like elementは、今回決定した塩基配列から、それぞれのIS-like elementに特異的なプライマーを選び、PCRを行うことにより検出した。その結果、no.1, no.13, no.19, no.22およびno.257のIS-like elementはそれぞれ、7株、0株、0株、26株、16株から検出され、*cfiA*は9

株から分離された。*cfiA*といずれかのIS-like elementを同時に保有する株は1株のみであった。

さらに、イミペネムと接触することにより、one-step mutationを起こし、耐性化する*B. fragilis*株がどの程度あるかを検討したところ、*cfiA*とIS-like elementを有する2株、*cfiA*のみを有する7株において、イミペネムに耐性化 (MIC値、 $\geq 16 \mu$ g/ml)する株は認められなかった。このことから、薬剤との接触により容易にイミペネム耐性株が多数出現する可能性は低いものと思われた。

D. 結論

ISの直上流に位置する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を用いたPCRは、メタロ- β -ラクタメースを産生しイミペネムに耐性の*B. fragilis*を迅速に検出するのに極めて有用な方法であると思われた。

また、イミペネム感性的*B. fragilis*がイミペネムと接触することにより耐性化する現象は、存在したとしても、その頻度は極めて低いものと思われた。

E. 研究発表

KIKUO YAMAZOE, NAOKI KATO, HARU KATO, KAORI TANAKA, YOSHIHIRO KATAGIRI, KUNITOMO WATANABE: Distribution of the *cfiA* Gene among *Bacteroides fragilis* Strains in Japan and Relatedness of *cfiA* to Imipenem Resistance. *Antimicrob Agents and Chemother* 43(11):2808-2810, 1999

F. 知的所有権の取得状況

特になし。

Table 1. Susceptibility to imipenem, carriage of the *cfiA* gene, PCR amplification with primers of G and E, and metallo- β -lactamase producibility of *B. fragilis* strains tested.

Susceptibility to imipenem	Strain	MIC of imipenem (μ g/ml)	Metallo- β -lactamase	<i>cfiA</i> gene	PCR with primers G and E
High resistant	GAI 92082	>256	+	+	ca. 2.0-kbp product
	GAI 30079	256	+	+	ca. 2.0-kbp product
	GAI 92684	256	+	+	ca. 2.0-kbp product
Low resistant	GAI 20464	32	+	+	ca. 2.0-kbp product
	GAI 20436	16	+	+	ca. 2.0-kbp product
	GAI 92087	16	+	+	ca. 2.0-kbp product
Intermediate	1 strain	8	-	+	ca. 0.4-kbp product
	2 strains	8	-	-	No product
Susceptible	9 strains	≤ 1	-	+	ca. 0.4-kbp product
	147 strains	≤ 1	-	-	No product

研究分担報告書

薬剤排出ポンプ及びメタロβ-ラクタマーゼ発現による薬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
研究協力者	中野 厚子	東海大学医学部 分子生命科学部門
研究協力者	荒川 宣親	国立感染症研究所 細菌血液製剤部

研究要旨

緑膿菌の多剤交叉耐性は先天的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, MexCD-OprJ及びMexEF-OprN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これらの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ポンプの高度発現株の検索を行った。そこではモデル実験としてMexAB-OprMポンプの外膜蛋白であるOprMに対する抗体、MexEF-OprNポンプの内膜サブユニットであるMexFに対する抗体を調成し、加熱処理緑膿菌の全菌プロット法を用いてその検出を試みた。その結果外膜蛋白、内膜蛋白いずれに対する抗体を用いた方法によってもポンプ発現菌を約3時間内に検出できた。次にメタロβ-ラクタマーゼに対する抗体を準備し全く同様の手技を用いてメタロβ-ラクタマーゼ産生株の検出を試みたところ、この方法でも効率よく迅速にメタロβ-ラクタマーゼを検出できることが明かとなった。更には外膜蛋白OprDポーリンの検出の実験でも満足の行く結果を得た。更にこの方法を臨床分離株で試すため臨床分離薬物耐性を選りOprM、MexF、メタロβ-ラクタマーゼもしくはOprDポーリンの発現株の検出を行った。その結果この方法は臨床的に応用できる手技であることが明かとなった。

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病院内感染の起因菌としてMRSAなどと並んで大きな問題を残している。元来弱毒性の緑膿菌が院内感染起因菌として問題となる背景にはこの菌の毒性もさることながら、多くの構造的にまた作用機作の上からも関連性の薄い抗生物質に対して交叉耐性を示すことにある。この緑膿菌における交叉薬剤耐性に関しては長年外膜における抗生物質の透過障害がその主たる原因であると説明されてきた。最近になって外膜透過性のほかに新しい型の薬剤耐性を説明できるような現象

が出現した。それは一旦細胞中に達した薬剤を細胞外に排出するようなポンプが存在するという事実の発見である。緑膿菌の染色体には*mexA-mexB-oprM*の3個の蛋白質をコードするオペロンが存在し、これらの遺伝子産物であるMexB及びMexAは内膜に結合した蛋白で各々に排出ポンプ本体、及び膜融合蛋白であると考えられている。OprMは外膜に結合した蛋白で内膜から排出される抗生物質を効率よく外膜を越えて細胞外に出すチャンネル蛋白であると考えられている。従って緑膿菌では薬剤の内向き透過性では外膜における堅い障壁が存在し、更にこの障壁を越え

て細胞内に達した薬剤は細胞膜に存在する排出蛋白によって細胞外に放出される。結果として細胞内の薬剤濃度は常に低く保たれていることになる。それではこのような排出ポンプはどのような状態で発現されているかということが問題である。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

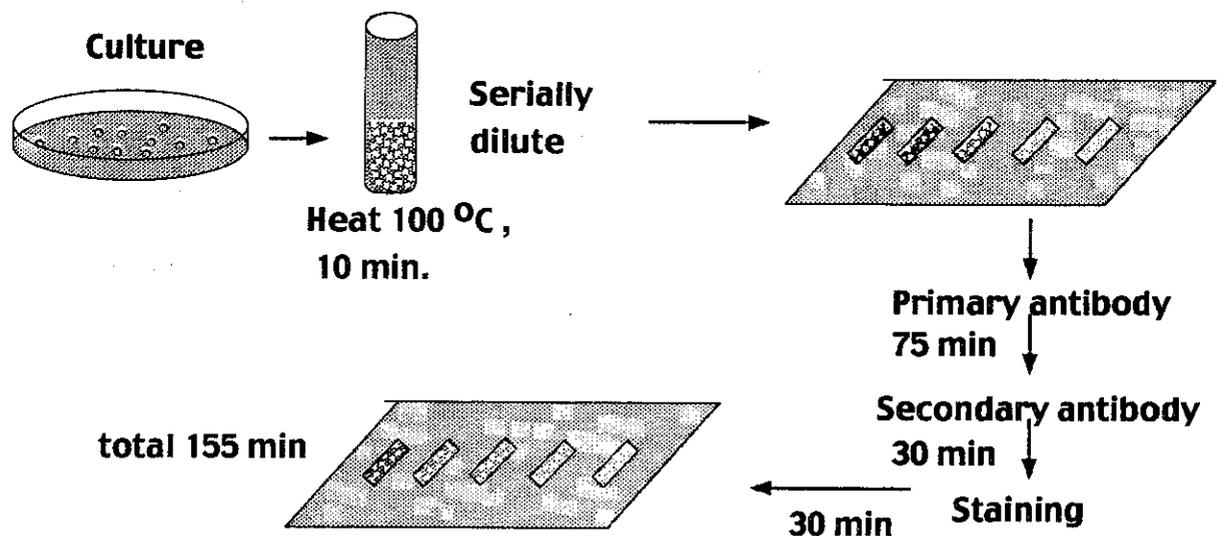


図1、ウエスタンブロット法による排出ポンプ検出の
手順及びそれに要する時間

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係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まず排出ポンプを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及びその他の排出ポンプの発現頻度を検索することを目的とした。

さらにまた最近では緑膿菌の中にはメタロβラクタマーゼを産生する菌が出現してきた。その結果メタロβラクタマーゼの高発現とOprDポーリンの欠損によるイミペネム耐性菌が問題となってきた。そこで2番目の目的としてはメタロβラクタマーゼ発現とOprDポーリン欠損株の迅速診断をも行うことを目的とした。

B. 研究方法

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にそれを弱酸性の条件下に溶出した。メタロβラクタマーゼに対する抗体は高度に精製されたメタロβラクタマーゼをウサギに接種することによって得

た(国立感染症研究所、荒川博士より分与)。

菌液の作製及びメンブレンへの吸着—菌の浮遊液は寒天固形培地上に育成した菌から調成し、 $A_{600}^{1cm}=0.15$ の間になるよう20mMリン酸緩衝液pH7.0に浮遊した。この菌浮遊液を100度10分間加熱した後2倍希釈法により連続的に希釈し、これの100μl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抗体もしくは抗メタロβラクタマーゼ抗体で75分間処理した後にブロッキング操作を行ひ、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蛋白もしくはメタロβラクタマーゼ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より判定した。この全操作に要する時間は約180分以内であった（図1参照）

C. 研究結果

C-1. MexAB-OprMの発現（nalB・タイプ）による耐性菌の検出

排出ポンプを発現している菌株の検出に関する実験（OprM発現株を中心として記述する。他のポンプサブユニット検出に関しても基本的には同じである。）

研究室保存株における実験——緑膿菌の標準株PA01について液体培地から得られた菌体では $A_{600}^{1cm}=0.15$ 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PA06006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16倍希釈であるという結果が得られた。（図2）

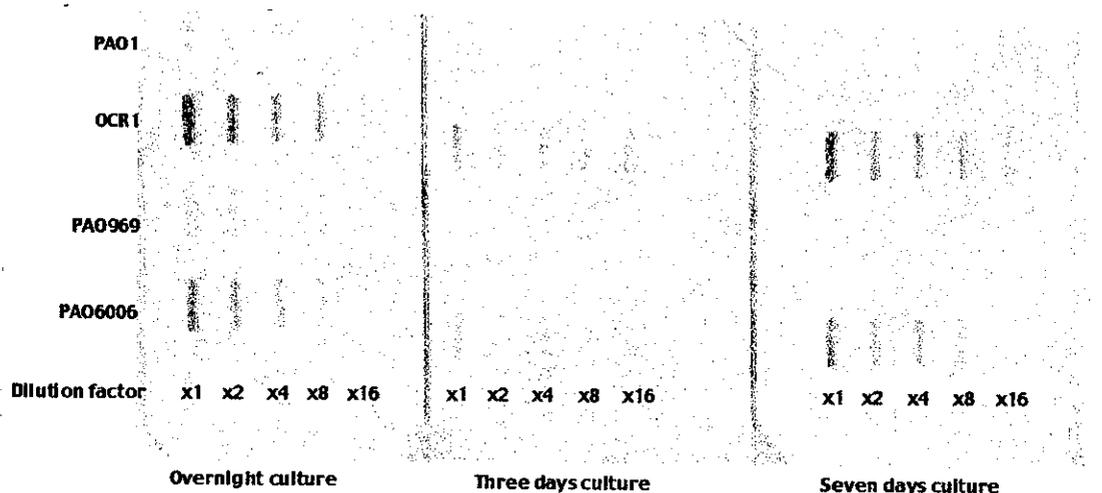


図2. 標準株及び排出ポンプ高発現株を用いたOprM蛋白の検出
PA01, 野生株; PA0969, 野生株; OCR1, nalB株; PA06006, nalB株

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。（図省略）

以上の結果からこの方法を用いた排出亢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应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3、4、5）

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。

C-2. MexEF-OprNの発現（nfxC-タイプ）による耐性菌の検出

nfxC遺伝子の変異によりMexEF-OprNが発現し緑膿菌は特異的な耐性パターンを示す。そこで

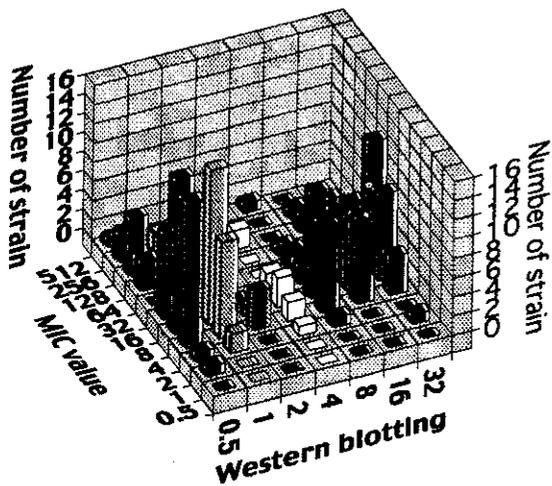


図3、多剤耐性臨床分離株における
ピペラシリンのMICとOprM発現の相関関係

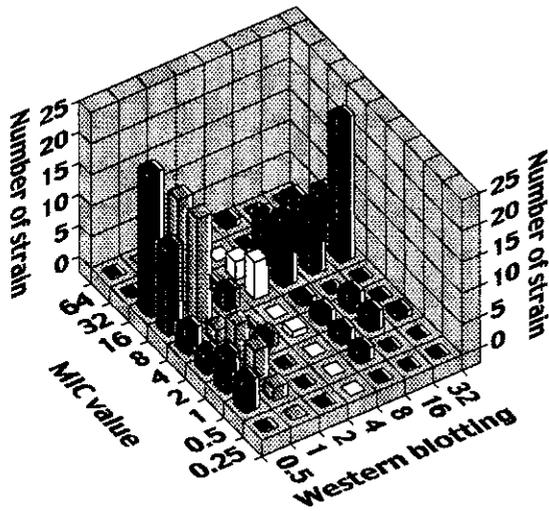


図4、多剤耐性臨床分離株における
オフロキサシンのMICとOprM発現の相関関係

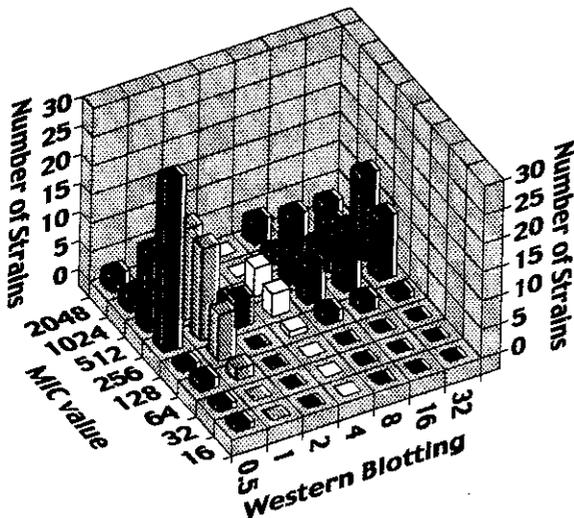


図5、多剤耐性臨床分離株における
クロラムフェニコールのMICとOprM発現の相関関係

*nfxC*タイプの耐性菌の検出のために我々は MexEF-OprNポンプサブユニットのうちMexFサブユニットに対する抗体を作成した。このMexF蛋白は内膜を貫通する膜蛋白であるがMexFを使ったのには二つの理由がある。一つは内膜蛋白を指標として迅速診断が可能であるかという疑問に答えること及び他の一つはもし使用可能であるとするならば耐性菌の約何パーセントが*nfxC*タイプ変異菌であることを明かすることにある。全菌を使用したプロット法を用いて*nfxC*株であるKH4014a及びその親株でMexEF-OprNを発現していないPAO4009株におけるMexFの発現を検定した。(図6)

x16	x8	x4	x2	x1	Dilution
					P10
					P11
					P12
					P13
					PAO4009
					KH4014a
					P14-1
					P14-2
					P15
					P16

図6、MexF抗体を用いた*nfxC*-タイプ耐性菌の検出
PAO4009, 野生株; KH4014a, *nfxC*株; Pxx番号の付いたものはすべて臨床分離株

この結果からMexポンプの内膜成分に対する抗体を使用することによってポンプの発現を検出することが可能であることが明らかとなった。そこで次に臨床分離薬剤耐性株の内OFLXのMICが2 μ g/ml以上のもの145株を選び全菌プロット法でMexFの発現を調べたところ11株が陽性であった。従ってこの検定による*nfxC*タイプポンプ発現株の出現率は約6.8%であった。

C-3. メタロ β -ラクタマーゼ産生による耐性菌の検出

次にメタロ β -ラクタマーゼを産生する菌の迅速診断方法を確立するため抗メタロ β -ラクタマーゼ抗体を用いた全菌プロット法を開発した。手技的には上に述べたOprMやMexF発現による耐

x16	x8	x4	x2	x1	Dilution
					IPM-R
					IPM-S
					SHV-12
					TEM-26
					PA01
					pMS363

図7. メタロβラクタマーゼ抗体を用いたメタロβラクタマーゼ陽性菌の検出、菌株については本文を参照

性菌の検出と同じである。メンブレン上にプロットされた加熱処理全菌を希釈しこれを抗メタロβラクタマーゼ抗体を用いて染色する方法である。陽性対照としてはメタロβラクタマーゼのクローンに有する緑膿菌（pMS363）及びメタロβラクタマーゼ陽性の緑膿菌（IPM-R）の株を用いた。陰性の対照としてはIPM-S、及びPA01株を用いた。その結果pMS363を有する株では32倍希釈まで陽性反応を示し、IPM-R陽性株でも8倍希釈まで陽性反応を示した（図7）。これらの対照株とは別に広域βラクタマーゼ（ESBL）産生株である*Klebsiella pneumoniae* SHU12株及びTEM-26βラクタマーゼ産生大腸菌を検定の対照としたがいずれも陰性対照株と同じであった。しかしながら大腸菌株においては弱いながら非特異的反応が見られるようであった。後にメタロβラクタマーゼ陰性大腸菌数株について調べたところ抗血清の特異性に問題があった（図省略）。この問題は血清を大腸菌で吸収することによって解決できるものとする。

このようにして確立したメタロβラクタマーゼ産生株検出方法を用いて、臨床分離株のうちイミペネム MICが2μg/ml以上を示す173株を選びメタロβラクタマーゼ産生性を検討した。その結果18株がメタロβラクタマーゼ陽性を示し、約10%の陽性率であることが明らかとなった（図8）。但しこれらの菌株は同一病院内で得られたイミペネム耐性株であるのでこの陽性率が日本の平均的メタロβラクタマーゼ陽性率と判断するのは早計である。只ここで明らかなことはこ

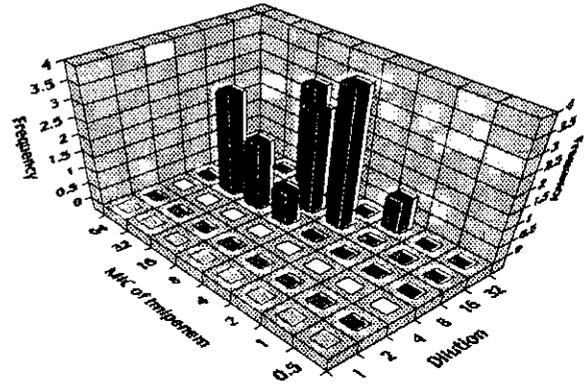


図8. メタロβラクタマーゼ陽性を示した株のイミペネムのMIC値とプロット陽性の相関関係

の検定法がメタロβラクタマーゼ陽性株の検出に使用可能であると判断できる。

C-4. OprDポアーリン欠損による耐性菌の検出

次にイミペネム耐性菌で問題となるのは外膜のOprDポアーリン欠損株である。そこで本研究では抗OprD抗体を用いて上記同様に全菌プロット法によるOprDポアーリンの検出を行った。手技に関しては上記のOprM及びメタロβラクタマーゼの検出法と同一である。陽性対照としてはOprDポアーリン陽性であることが明かな研究室株PA01を用いた。その結果PA01株では16倍希釈まで陽性反応を得ることが出来た。（図9）。一方陰性対

x16	x8	x4	x2	x1	Dilution
					P7
					P21
					P22
					P26
					PA01
					TNP002
					P82
					P27
					P28
					P30

図9. 抗OprD抗体を用いたイミペネムポアーリンの検出 PA01, 野生株; TNP002, OprD陰性株; Pxx番号の付いたものはすべて臨床分離株

照としてはOprD陰性株TNP002株を用いたところこの株におけるOprDポアーリンは検出できなかった（図9）。その他に臨床分離イミペネム耐性株18株についてOprDの発現を検定した。その結果18株中14株がOprD欠損であることが明らかとなった。このような結果を合わせメタロβラクタ

マーゼ産生、OprD欠損を一つの表にまとめると表1の様な結果となった。それらの結果から明らかなことはメタロβ-ラクタマーゼ活性及びOprD欠損とイミペネム耐性が正確に尚かつ迅速に診断できるようになった事である。

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。

次にポンプサブユニットの内膜成分に対する抗体を用いた場合でもポンプの発現を迅速に検出できるか否かを明かとする目的でMexEF-OprNポンプのMexFに対する抗体を用いて同様の実験を行った。その結果抗MexF抗体を用いても抗外膜蛋白抗体を用いた時と同様ポンプの発現を検出できることが明らかとなった。このように全菌ブロット法を用いたポンプ発現菌の検出法が完成したので次に臨床から分離された多剤耐性株を用いてMexAB-OprMポンプの高発現株 (*nalB*-タイプ) 及びMexEF-OprNポンプの発現株 (*nfxC*-タイプ) を検索したところMexAB-OprM発現株は約全体の耐性株の約35%、またMexEF-OprNポンプを発現した株は全体の約6.8%であった。緑膿菌の薬剤排出ポンプとしてはこれらの他に *nfxB* 遺伝子によって制御されている MexCD-OprJポンプが知られているが今回は利用可能な良質の抗体が得られなかったので実験を行わなかった。しかしながら同じ手技を用いれば質の良い抗体を得てさえすれば良い結果が得られるものと考えられる。

次に最近問題となっているメタロβ-ラクタマーゼの検出法を同様に全菌ブロットを用いて行った。その結果メタロβ-ラクタマーゼの発現

も容易に尚かつ迅速に検出できる事が出来ることが明らかとなった。この全菌ブロット法を用いて臨床分離多剤耐性株におけるメタロβ-ラクタマーゼ発現の検出を行ったところ検出渉度は約10%であった。

E. 結論

加熱処理全菌細胞をメンブレンフィルター上にブロットし、これに抗排出ポンプ抗体、抗メタロβ-ラクタマーゼ抗体、抗OprDポーリン抗体を作用させ発色させる事によって目的とする排出ポンプ発現による耐性菌、メタロβ-ラクタマーゼの発現による耐性菌及びOprDポーリンの発現による耐性菌の迅速診断法を確立した。この方法を用いれば平板状にコロニーが出現してから約3時間以内に目的とする耐性菌を検出することが可能である。従ってこの方法を応用すれば排出ポンプ、メタロβ-ラクタマーゼ、OprDポーリンのみならず蛋白を発現するほとんどあらゆる耐性因子を短時間に検出することが出来る。

F. 研究業績

(論文として印刷されたもののみを収録した。学会発表などはすべて省略した)

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.43, 1301-1303

Hiroshi Yoneyama and Taiji Nakae 2000

Localization and membrane topology of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa* J. Biol. Chem. 印刷中

- 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. 274, 10517-10522
- 中江太治 1998 非特異的抗生物質耐性の機序 Clinical View 4 4-5
- Akira Nakajima, Mie Hoshikawa, Taiji Nakae 1998 Antibiotic stress induces a large amount of outer membrane protein in *Pseudomonas aeruginosa* FEMS Microbiol. Lett. 165 261-265
- Eisaku Yoshara, Hiroshi Yoneyama, Toshihisa Ono, Taiji Nakae 1998 Identification of the Catalytic Triad of the Protein D2 Protease in *Pseudomonas aeruginosa* Biochem. Biophys. Res. Commun. 247 142-145
- 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
- Yoneyama, H., Ocaktan, A., Gotoh, N., Nishino, T., and Nakae, T. 1998 Subunit Swapping in the Mex-Extrusion Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Biochem. Biophys. Res. Commun. 244 898-902
- Nakae, T., Yoshihara, E., Yoneyama, H. 1997 Multiantibiotic resistance caused by active drug extrusion in the hospital pathogen J. Infect. Chemother. 3 173-183
- Kitahara, T., Yoneyama, H., Nakae, T. 1997 Antibiotic diffusion pathways in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* Biochem. Biophys. Res. Commun. 238 457-461
- Ocaktan, A., Yoneyama, H. and Nakae, T. 1997 Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the Mex-A-MexB-OprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa* J. Biol. Chem. 272 21964-21969
- Yoneyama, H., Ocaktan, A., Tsuda, M., and Nakae, T., 1997 The role of mex-gene products in antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 233 611-618
- Nakae, T. 1997 Multiantibiotic resistance caused by active drug extrusion in *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Microbiology 13 273-284
- 中江太治 1997 多剤交叉耐性緑膿菌、薬を細胞から閉め出す Mebio 5 47-55
- 中江太治 1997 薬剤排出蛋白の発現による多剤耐性 日本臨床 55 161-166

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）

分担研究報告書

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 （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・客員教授

研究要旨 マクロライド系抗生物質耐性に関与する *Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌；ブ菌）の遺伝子には、① 23S rRNA の特定アデニンがメチル化され、マクロライド（Mac）、リンコサマイド（LCM）及びストレプトグラミン B（STG-B）抗生物質の交差（MLS）耐性にかかわる *erm* 遺伝子、② 我々の見出した能動排出にかかわる *msrSA* 遺伝子、③ 薬剤不活化にかかわる *vgb*、*lin* 遺伝子などが知られている。三年に及ぶ耐性機構研究の結果、我々は *msrSA* 遺伝子のみならず、Mac 不活化遺伝子 *mphBM* を MLS 耐性ブ菌が保有することを新たに見出した。一方、臨床分離 Mac 耐性ブ菌は殆ど（95%以上）*erm* 遺伝子を保有しており、*msrSA* 遺伝子の保有率は約 3.6%、*mphBM* 遺伝子のそれは極めて低率であった。また、臨床検体について PCR 法による *ermA* 遺伝子の迅速・高感度検出の実用性を検討した。その結果、 10^2 CFU オーダーの菌量（耳腔及び鼻腔拭い液）が検出可能となり、検出時間は約 3.5 時間に短縮できた。更に、*erm* allele 遺伝子間の同時検出法の実用化の可能性を明らかにした。

研究協力者 松岡 眞由美
北海道薬科大学 微生物学
講師
小林 弘幸
北海道薬科大学 微生物学
助手

必要がある。先ず標記テーマに絞って両面から研究を以下の如く進めた。

本薬剤耐性機構分野の研究では、1977 年ハンガリーで分離された PMS 耐性ブ菌 PM2104 株由来の当該耐性遺伝子をコードしている plasmid pEP2104 を形質導入したブ菌 8325(pEP2104)株の耐性機構を探ることとした。

耐性機序別迅速検出法開発分野として、ブ菌における Mac 耐性遺伝子の圧倒的多数を占める *erm* 遺伝子について、PCR/RFLP 法による *erm* 遺伝子型の識別を行い、臨床分離 MLS 耐性ブ菌における分布状況を調べることにした。併せて本邦臨床分離ブ菌における *msrSA* 及び *mphBM* 遺伝子の保有状況につき選及調査を行った。

PCR 法による *ermA* 及び *msrSA* 遺伝子の検出感度並びに臨床材料からの *ermA* 遺伝子の迅速・高感度検出法の可能性、*erm* allele 遺伝子（A,B,C）間の識別に加え *msrSA*、*mphBM* の同時検出の可能性などを検討した。

A. 研究目的

ブ菌におけるマクロライド系抗生物質耐性機序は、① その殆どが *ermA,B,C* 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变化に基づいている。しかし、② 近年（1989）*S. epidermidis* に検出された *msrA*（erythromycin（EM）、oleandomycin（OL）等の 14 員環 Mac 及び STG-B の能動排出に関与する MS 耐性遺伝子）に基づく耐性表現型と極めて類似の、すなわち 16 員環 Mac のマイシナミシンを含む部分的マクロライド（PMS）耐性株がブ菌においても分離されてきた。また、③ *vgb* 遺伝子保有株にみられる STG-B の加水分解、*lin* 遺伝子保有株にみられる LCM の修飾などが知られている。また近年、複数の *erm* 遺伝子並びに *erm* と *msr* 両遺伝子が存在する耐性球菌属も報告され、当研究室においても臨床由来ブ菌の Mac 耐性 plasmid pMS97 上に *erm* と *msr* を併せ持つことを見出した。また、この plasmid は更に大腸菌の Mac 不活化遺伝子 *mphB* と 50% ホモロジーのある *mphBM* 遺伝子を有していることを、我々はシーケンス解析の結果初めて明らかにした。このことはブ菌におけるマクロライド系抗生物質既知耐性機構に加え、新たな耐性機構を有する Mac 耐性ブ菌の出現をも視野に入れた識別可能な迅速検出法を開発する

B. 研究方法

1) 使用ブ菌株：*ermA* 保有 ISP447 株、*ermB* 保有 8325(pI258)株、*ermC* 保有 MS13837 株、*msrSA* 保有 8325(pEP2104)株、*erm* like、*msrSA'* 及び *mphBM* 保有 NCTC8325(pMS97)株、*ereA* 保有大腸菌 BM694/pAT63 株、標準感受性ブ菌 NCTC8325 株、及び臨床分離 MLS 耐性ブ菌 232 株（1993 年北海道内臨床分離株 113 株、旭川医科大学分離 64 株及び群馬大学・医学部保存 55 株）。

2) PMS 耐性機構解析：PMS 耐性ブ菌 8325 (pEP2104)株について、EM の細胞内蓄積量の動的