

解析、耐性に關与する細胞膜蛋白質の分子遺伝学的解析及び常法により当該耐性遺伝子のDNA塩基配列を決定した。

3) Mac不活化能解析: Macのラクトン環を加水分解し不活化する *ereA* 保有大腸菌 BM694/pAT63 株を陽性コントロールに用い、*mphBM* 遺伝子保有株を EM 存在下で培養した培養液について、ディスク法により EM の不活化能の有無を調べた。

4) PCR 法及びサザンハイブリダイゼーション法による *mphBM* 遺伝子の検出: プ菌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) を含むようなプライマーを作成し、94°C, 135sec の後、94°C, 45sec, 55°C, 30sec, 72°C, 90sec を 30 サイクル、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'-AGTAGAATGGGTTTGTGAGAC TGC-3', 5'-GGTAAAGCTGGAGGT-GAAAT-3', 642bp) を含むように作成したプライマーにより、plasmid pMS97 を template とし得られた PCR product (377bp) をプローブとして用い、北海道内臨床分離 Mac 耐性ブ菌 177 株 (1993 年北海道内臨床分離株 113 株、旭川医科大学分離 64 株) について行った。

5) PCR/RFLP 法による *erm* 遺伝子型の識別: プ菌より抽出した total DNA を template とし、*ermA*, *AM*, *B*, *BC*, *C*, *C'* (=M), *G* 遺伝子の検出が可能なユニバーサルプライマーを用いる Arthur らの方法<sup>2)</sup> に従い PCR を行った。*erm* 遺伝子型の識別は、PCR 増幅断片を制限酵素 *Acc I*、*Bcl I*、*Rsa I* 又は *Taq I* で消化し (RFLP<sup>2)</sup>)、その消化パターンより決定した。

6) PCR 法による *ermA* 及び *msrSA* 遺伝子の検出感度: 培養菌体を滅菌生理食塩水 (生食) で洗浄後、生食又は培地 (BHI: brain heart infusion) で 10<sup>8</sup>CFU/ml から 10 段階希釈し、迅速化のため菌液のまま PCR に用いた。*ermA* 遺伝子の検出 (約 530bp) は、前記 Arthur らの方法<sup>2)</sup> に従い、*msrSA* 遺伝子については、表皮ブドウ球菌<sup>3)</sup> の当該遺伝子塩基配列もとに ATP-binding domain の後半 (5'-AGATCGTTAAGTGCATCAA-3', 5'-GATCGGTTATGGTACTATTG-3', 823bp) を含むようなプライマーを作成し、94°C, 135sec の後 (この時菌体 DNA が同時抽出されると考えられる)、94°C, 45sec, 55°C, 30sec, 72°C, 90sec を 30 サイクル、最後に 72°C, 10sec の反応を行った。

7) 臨床検体からの *ermA* 遺伝子迅速・高感度検出法の検討: 滅菌 phosphate buffered saline (PBS) に浮遊させた健康人の耳腔及び鼻腔拭い液、並びに健康人血液に、*ermA* 保有 ISP447 株を 10<sup>8</sup> ~ 10<sup>6</sup>CFU/ml 添加したものを検体として用いた。耳腔及び鼻腔拭い液は沸騰水浴中 10 分間加熱、氷冷後 15,000 × g、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、耳腔及び鼻腔拭い液に 0.1% dithiothreitol (DTT) を同容量加え、30 秒間激しく攪拌均質化した

後、15,000 × g、1 分間遠心して沈査を集め、これを TE buffer (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 15,000 × g、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。血液サンプルについては、ヒト血液用 Drop PCR Kit (ニッポンジーン) を用い、*ermA* 遺伝子の検出を試みた。PCR は、前記 Arthur らの方法<sup>2)</sup> に従い行った。また、キャピラリー PCR 法による反応時間の短縮についても検討を行った。

8) 耐性機序別同時検出 (multiplex PCR) 法の検討: *ermA*, *B*, *C*, *msrSA* 及び *mphBM* 遺伝子の同時検出用プライマーを作成し、PCR 法による同時検出条件の検討を行った。*ermA*, *B*, *C* 遺伝子検出用のプライマーは、それぞれ *ermA* 遺伝子の内部配列 (3'-TCTAAAAAGCATGTAAGAA-5', 3'-CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT-5', 440bp)、*ermB* 遺伝子の内部配列 (3'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-5', 3'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-5', 656bp) 及び *ermC* 遺伝子の内部配列 (3'-TCAAAACATAATATAGATAAA-5', 3'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT-5', 254bp) を含むよう、また *msrSA* 及び *mphBM* 遺伝子の検出用プライマーは、それぞれの内部配列 (3'-AGGCACGGTTGAGAAGGCTG-5', 3'-CGATAATTTTCGTTCTTTCCCC-5', 508bp) 及び (3'-GATTTACAC AACATACCAGA-5', 3'-ATTTACCTCCAGCTT TACC-5', 377bp) を含むように作成し、multiplex PCR 法での検出条件の検討を行った。

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

<sup>2)</sup> Urakawa H., Kita-Tsukamoto K. and Ohwada K. *FEMS Microbiol. letter* 152, 125-132, 1997. <sup>3)</sup> Ross. J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, S. Baumberg and J. C. Wootton, *Molecul. Microbiol.*, 4, 1207-1214, 1990.

## C. 研究結果

1) マクロライド耐性機構の解析: PMS 耐性ブ菌株 8325 (pEP2104) は EM を不活化せず、本菌由来リボソームは薬剤感受性を示した。本菌の細胞内 EM 蓄積量は感受性菌より低く、carbonyl cyanamide-*m*-chlorophenylhydrazine (CCCP) 添加により感受性菌と同程度まで増加した。

PMS 耐性には、63kDa 細胞質膜タンパク質 (MsrSA) が関与し、その N 末端アミノ酸 31 残基の配列及び構造遺伝子 (*msrSA*) の塩基配列は、それぞれ、*S. epidermidis* 由来 (能動的薬剤排出に關与する) の膜タンパク質 (MsrA) 及び MS 耐性遺伝子 (*msrA*) と一致していた。構造型 PMS 耐性変異株由来の当該耐性遺伝子の塩基配列より、PMS 耐性誘導の制御にはリーダーペプチド領域の關与が示唆された。また、群馬大学・医学部保存ブ菌 55 株について、遡及的

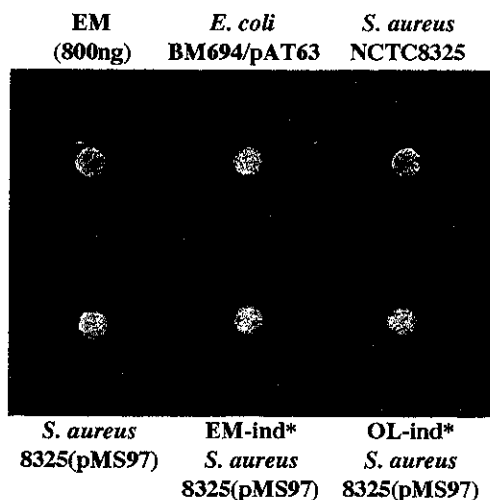


図1 Antibiotic activity of EM in supernatant solutions obtained from the indicated strains after they had been incubated at 37°C for 24 hours in the presence of the drug

Seed agar included *Micrococcus luteus* ATCC9341 as an indicator bacterium.

\* EM-ind and OL-ind : the resistance of the cells to EM and OL (1.35 μg/ml each) was previously induced by an overnight exposure to the drugs, respectively.

疫学調査を行った結果、1971年と1983年に1株ずつ *msrSA* にコードされた PMS 型耐性ブ菌が本邦にも存在していた(出現率約 3.6%)。

2) *mphBM* 遺伝子保有菌による Mac 不活化能解析: ブ菌 8325(pMS97) 株を EM 存在下 BHI で 1 夜培養後、その一定量をペーパーディスクに含ませ、ディスク拡散法により不活化能を調べたところ、陽性コントロールの *ereA* 保有大腸菌 BM694/pAT63 株と同様、EM 不活化能が当該ブ菌に認められた (図 1)。

3) *mphBM* 遺伝子の疫学調査: 当該遺伝子の形質発現の検出をより確実にするため、北海道内臨床分離 Mac 耐性ブ菌 177 株 (1993 年北海道内臨床分離株 113 株、旭川医科大学分離 64 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、及び得られた product に対するサザンハイブリ

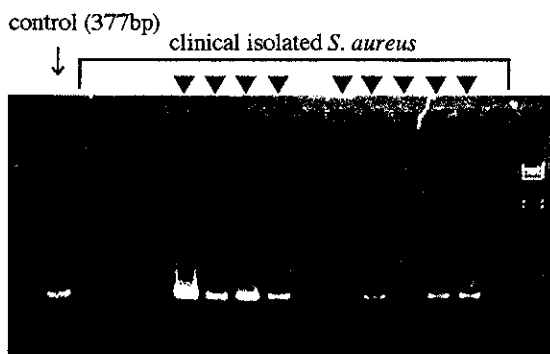


図2 PCR amplification of *mphBM*

ダイゼーション法による *mphBM* の確認を行った。その結果 PCR 法では 11 株において PCR product (377bp) が得られた (図 2)。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 (データ未掲載)。

4) PCR/RFLP 法による *erm* 遺伝子型の識別: ブ菌由来の既知 *erm* 遺伝子は *ermA*, *B*, *C*, *C'* (=M) の 4 種類である。前述 Arthur らの方法<sup>1)</sup> に従い、*erm* 遺伝子の検出を行ったところ、本邦臨床分離 MLS 耐性ブ菌 168 株 (1993 年北海道内臨床分離株 113 株、群馬大学・医学部保存 55 株) 全てから *erm* 遺伝子が検出された。しかし、この *erm* 遺伝子検出法では、*erm* alleles 即ち *ermA*, *AM*, *B*, *BC*, *C*, *C'* (=M), *G* (*Bacillus* 属、*Bacteroides* 属由来の *erm* 遺伝子で、ブ菌ではまだ見出されていない) の型別までは識別できない。そこで *erm* 遺伝子増幅断片 (約 530bp) の制限酵素切断部位が各 *erm* 遺伝子により異なっていること (図 3) に着目し、RFLP 法による *erm* 遺伝子型の識別を試みた。予想通り、*ermA*、*ermB*、*ermC* 遺伝子増幅断片は特有の制限酵素切断パターンを示した (図 4)。この結果をもとに、1993 年北海道内臨床分離ブ菌 113 株に本法を適用したところ、*ermA* と *ermC* 以外に、*ermA* と *ermB* を同一株内に保有する 2 株が得られた (図 4)。この 2 株について、更に確認のため Sutcliffe らの報告しているプライマー<sup>4)</sup> を用い、個別に *erm* 遺伝子の検出を行ったところ、

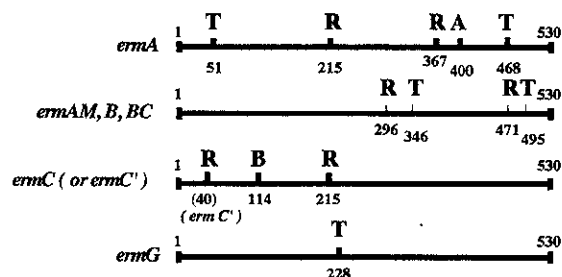


図3 Expected fragment patterns of *erm* DNAs that were amplified by PCR and digested by restriction enzymes  
A; *AccI*, B; *BclI*, R; *RsaI*, T; *TaqI*

表1 Distribution of *erm* genes among 113 MLS-resistant strains of *S. aureus* 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	91	0	0	2
B group	0	0	1	0
C group	19	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)

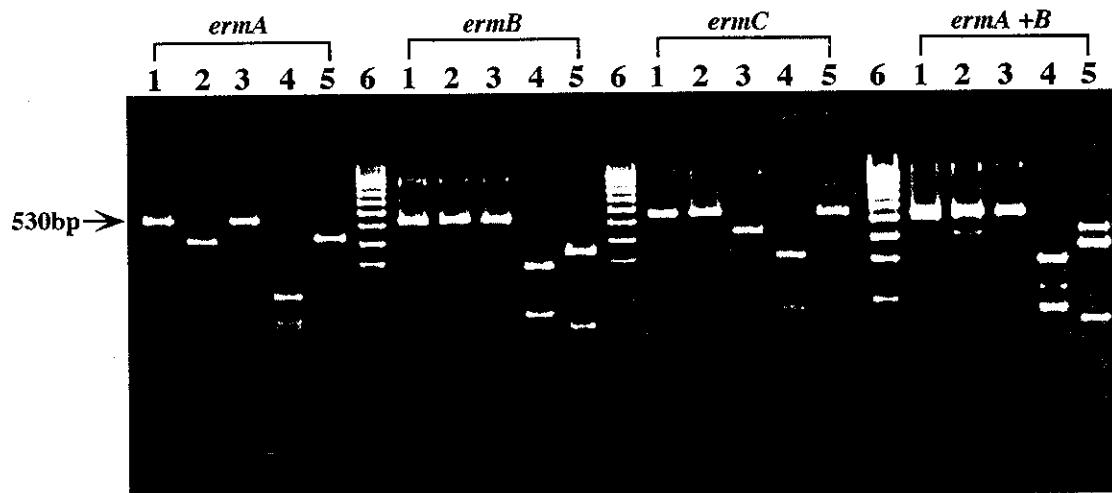


図4 RFLP analysis of *erm* DNA amplified by PCR

lane 1: An *erm* DNA, PCR-product, from *S. aureus*. lane 2: The PCR-product digested by *Acc* I.  
 lane 3: The PCR-product digested by *Bcl* I. lane 4: The PCR-product digested by *Rsa* I.  
 lane 5: The PCR-product digested by *Taq* I. lane 6: M.W. (100bp DNA ladder).

*ermA*と*B*の両遺伝子が検出された。即ち、1993年北海道内臨床分離ブ菌113株からは、*ermB*単独保有株は確認されず、*ermA*単独保有110株、*ermC*単独保有1株及び*ermA*及び*B*の2つの*erm*遺伝子を保有している株が2株確認された(表1)。

本検出法に要した時間は、約6.5時間であった。

4) Sutcliffe J., T. Grebe, A. T. Kamradt and L. wondrack, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2562-2566, 1996.

5) *ermA*及び*msrSA*遺伝子の検出感度と応用: 研究方法6)に従い、ブ菌培養菌体の生食希釈浮遊液をそのまま用い、PCR反応を行った場合、*ermA*及び*msrSA*遺伝子ともに $10^2$ CFU/tubeのオーダーでの検出が可能であった(図5)。しかし、培地あるいは

培養上清の共存はPCR反応を阻害した。この結果より、PCR反応を行うには阻害物質を除去あるいはDTT処理(後述)のように遮蔽する必要がある。

6) 臨床検体での検出感度の検討:  $10^2$ CFUオーダーでの検出が可能となったので、健康人の耳腔及び鼻腔拭い液に陽性コントロールとして外部から既知菌量を加えた*ermA*遺伝子の検出を試みた。耳腔拭い液では、サンプルの前処理無しでも $10^2$ CFUオーダー(既知菌量)での検出が可能であった。しかし同処理の鼻腔拭い液では $10^8$ CFUオーダーでしか検出できなかった。各種検討の結果、当該液をDTT処理することにより $10^2$ CFUオーダーまで検出感度を上げることに成功した(図6)。

7) 検出法の迅速化: 検出感度は $10^2$ CFUオーダーまで上げることができたので、キャピラリーPCRによる迅速検出のための最適条件を検討した。その結

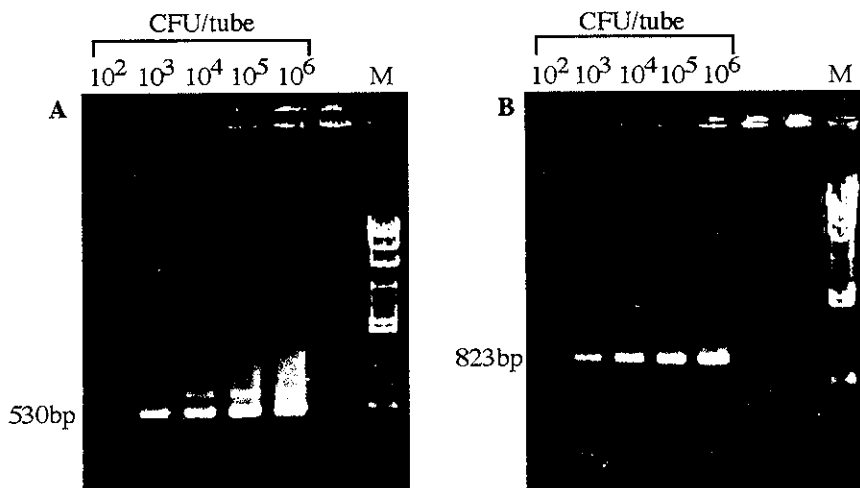


図5 Agarose 1% gel electrophoresis of PCR products, as shown in panels A and B, of *ermA* and *msrSA* genes, respectively

M:  $\lambda$  / *Hind*III

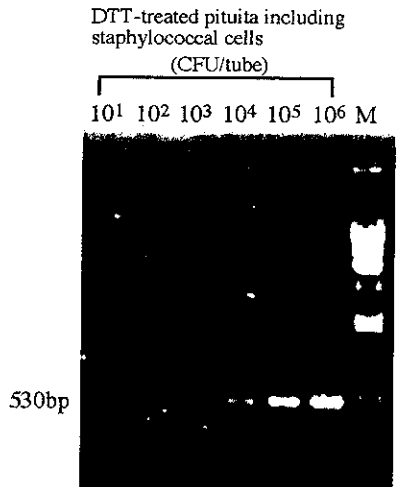


図6 Identification limits of a product within an *ermA* gene which was amplified by capillary PCR  
M:  $\lambda$  /Hind III

果 95°C, 3min, 37°C, 10sec, 72°C, 15sec の後、93°C, 10sec, 37°C, 10sec, 72°C, 15sec を 4 サイクル、93°C, 5sec, 37°C, 5sec, 72°C, 15sec を 45 サイクル、最後に 72°C, 4min 45sec で反応を行った結果、検出感度を落とすことなく、前処理から検出に至るまでの所要時間が、約 3.5 時間に短縮された。

なお、血液サンプルにおける検出感度は低く、 $10^6$  CFU のときに検出されたに過ぎない(データ未掲載)。今後の課題である。

8) 耐性機序別同時検出 (multiplex PCR) 法: 本方法を改良すれば耐性機序別高感度・迅速検出の可能性が更に期待される。そこで *erm* allele 遺伝子 (*ermA*, *B*, *C*) について product サイズの異なるプライマーを作成し、multiplex PCR 法で用いられる 10% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO) を加え、*ermA*, *B*, *C* の DNA template を混合したものに対し、94°C, 2min の後、94°C, 45sec, 55°C, 30sec, 72°C, 135sec を 30 サイクル、最後に 72°C, 10min で PCR 反応を行ったところ、*erm* allele 遺伝子間の同時識別が可能となった。しかし、この系に *msrSA* 及び *mphBM* 遺伝子を加えた PCR 反応では、各々の耐性機序別に特異的な PCR product の検出はできなかった。

#### D. 考察

薬剤耐性機構研究: 欧米より分離された PM 耐性 *S. epidermidis* は、能動排出に関与するとみなされている *msrA* 遺伝子を保有していた。この *msrA* と殆ど同じ遺伝子 *msrSA* が、ハンガリーより入手したブ菌にも存在していることを我々は明らかにした。また、Mac 不活化耐性遺伝子 *mphBM* を有する本邦分離ブ菌 1 株を新規に見出した。

北海道内臨床分離 Mac 耐性ブ菌 177 株について、*msrSA*、*mphBM* 遺伝子の関与する新規 Mac 耐性ブ菌の調査を行ったが検出されなかった。しかし、遡及

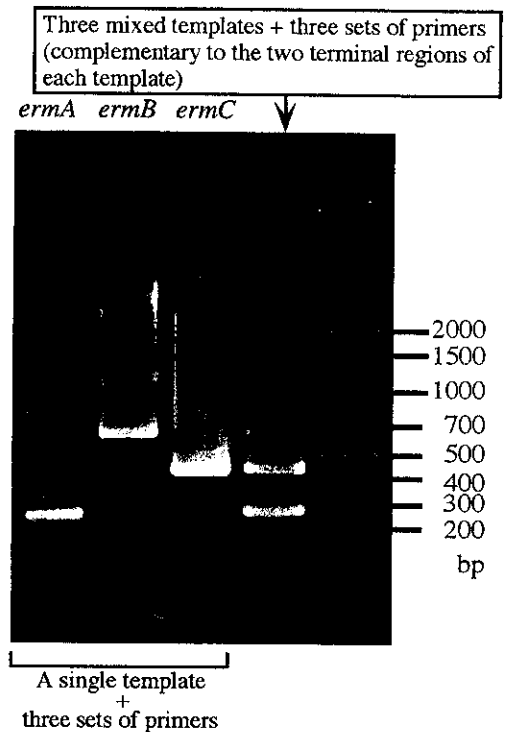


図7 Multiplex PCR products of *ermA*, *B*, *C*

調査を含む本邦分離の Mac 耐性ブ菌では、*erm* allele は勿論のこと、*msrSA* を保有するブ菌が約 3.6% 検出された。*mphBM* 遺伝子を保有するブ菌は 1 株を除き今日まで見出されなかったとは云え、この種の耐性ブ菌の増加あるいは新規 Mac 耐性ブ菌の出現の可能性にも注意を払い、今後とも監視を怠ってはならないと考える。

特定耐性遺伝子迅速検出: 我々は、PCR/RFLP 法による *erm* allele 遺伝子簡易識別の実用的応用を開発し、北海道内臨床分離ブ菌について本法を適用した(表1)。これは制限酵素レベルの違い (RFLP) にとどまらず(図3, 4)、一塩基レベルの違いをも検出する方法を開発出来れば、正確さや応用範囲において驚異的に拡大する可能性を秘めている。

耐性機序別迅速高感度検出: PCR 法による *ermA* 及び *msrSA* 遺伝子の検出では、PCR 反応阻害物質が存在していない場合、菌体の前処理なく PCR 反応に用いることができ、 $10^2$  CFU オーダーでの検出が可能であった。次に迅速化をめざしてキャピラリー PCR による *ermA* 遺伝子について検討を行った。その結果、鼻腔拭い液では DTT 処理後熱抽出、耳腔拭い液では熱抽出のみで  $10^2$  CFU オーダーまで検出感度を保つことが出来、且つ検出までの所要時間はキャピラリー PCR 法により、約 3.5 時間まで短縮出来た。しかし、培地、培養上清あるいは血液存在下では PCR 反応が阻害されたことから、臨床検体に PCR あるいはキャピラリー PCR 法いずれの方法を適用する場合にも、検体に存在する PCR 阻害物質を除去あるいは遮蔽するよう心がける必要がある。今回の検討結果より、総合的に判断してキャピラリー

PCR法の方が迅速・高感度診断に有利な方法と考えられる。

耐性機序別同時検出 (multiplex PCR) 法の検討: *ermA*, *B*, *C*, *msrSA* 及び *mphBM* 遺伝子の全てを同時検出する反応条件は現段階では設定できなかった。しかし、productサイズが異なるように工夫した *erm* 遺伝子のプライマーの組合せにより、*erm* allele 遺伝子 (*ermA*, *B*, *C*) 間の同時識別が可能である。このことから、より詳細な検出条件の検討により、全ての Mac 耐性遺伝子の検出のみならず、各菌種の耐性機序別迅速検出が可能になると考えられる。

## E. 結論

薬剤耐性機構の分野: PMS 耐性菌の耐性機構の研究より、Mac の能動排出に関与する *msrSA* 遺伝子が生化学的、遺伝学的研究から菌にも存在していることが確認された (新知見)。

Mac 不活化 *mphBM* 遺伝子が臨床分離 MLS 耐性菌由来 plasmid 上に見出された (新知見)。

耐性機序別迅速検出法の分野: PCR/RFLP 法による *erm* 遺伝子型の簡易識別が可能となり、北海道における MLS 耐性菌の *erm* 遺伝子型を調査したところ、殆ど *ermA* であった (表 1)。

*ermA* 及び *msrSA* 遺伝子の PCR 法での検出では、PCR 反応阻害物質が存在していない場合、菌体を直接 PCR 反応に用いることができ、 $10^2$ CFU オーダーでの検出が可能であった。

*ermA* 遺伝子の迅速・高感度検出法の検討では、キャピラリー PCR 法により、耳腔または鼻腔拭い液より  $10^2$ CFU オーダーで *ermA* 遺伝子の検出を可能にした。また、検出までの所要反応時間を PCR 法の約 6 時間から約 3.5 時間へと 2.5 時間短縮することができた。このことから、本法は迅速診断に有効な方法のひとつと考えられる。

耐性機序別同時検出法の検討では、PCR product サイズが異なるように各 *erm* 遺伝子のプライマーを設計し組合せることにより、*erm* 遺伝子の allele (*ermA*, *B*, *C*) 間の同時識別が可能となった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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) Yoshinori Nakajima: Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *J Infect Chemother* 5: 61-74 (1999)
- 3) M. Matsuoka, L. János, Kikutarou Endou and Y. Nakajima: Cloning and sequences of inducible and constitutive macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* that correspond to an ABC transporter. *FEMS Microbiol. Lett.*, 181, 91-100 (1999)

- 4) 松岡眞由美, 中島良徳: マクロライド系薬剤の耐性機構, 医学のあゆみ, 191, 1041-1045 (1999)

### 2. 学会発表

- 1) 小林弘幸, 松岡眞由美, 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 第 71 回日本細菌学会総会 (松本) 1998 年 4 月 2-4 日
- 2) 松岡眞由美, 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 回日本細菌学会総会 (松本) 1998 年 4 月 2-4 日
- 3) 小林弘幸, 松岡眞由美, 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 (水上) 1998 年 8 月 28-29 日
- 4) M. Matsuoka, M. Inoue and Y. Nakajima: A new class of *erm* genes mediating MLS-coresistance in *Staphylococcus 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, Sep. 24-27, 1998.
- 5) 松岡眞由美, 遠藤菊太郎, 小林弘幸, 中島良徳 3 種のマクロライド抗生物質耐性遺伝子 (*msrSA*'-*mphBM*-*ermGM*) を有する plasmid pMS97 の解析 第 72 回日本細菌学会総会 (東京) 1999 年 3 月 24-26 日
- 6) 桂嶋こず江, 松岡眞由美, 遠藤菊太郎, 小林弘幸, 中島良徳 黄色ブドウ球菌由来 plasmid pMS97 の新規 Mac 耐性遺伝子 第 119 回日本薬学会第 119 年会 (徳島) 1999 年 3 月 29-31 日
- 7) 小林弘幸, 松岡眞由美, 遠藤菊太郎, 中島良徳 黄色ブドウ球菌におけるマクロライド耐性 *erm* 遺伝子の迅速診断法 第 28 回薬剤耐性菌シンポジウム (水上) 1998 年 8 月 26-27 日
- 8) 松岡眞由美, 桂嶋こず江, 遠藤菊太郎, 小林弘幸, 中島良徳, 井上松久 黄色ブドウ球菌由来 plasmid pMS97 のマクロライド耐性遺伝子の解析 第 28 回薬剤耐性菌シンポジウム (水上) 1998 年 8 月 26-27 日
- 9) 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*. 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Hungary. Aug. 30 - Sep. 1. 1999.
- 10) 松岡眞由美, 桂嶋こず江, 遠藤菊太郎, 小林弘幸, 中島良徳 黄色ブドウ球菌におけるマクロライド耐性機構の解析 第 14 回微生物シンポジウム (新潟) 1999 年 9 月 17-18 日

## β-ラクタム薬加水分解酵素 (β-ラクタマーゼ) 産生菌の迅速検出法の検討

井上松久・岡本了一 北里大学医学部微生物学

代表的なβ-ラクタム薬を用いて各 class 型β-ラクタマーゼ検出の手順を決めた。次いで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 Cβ-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 型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。さらに PCR 法を用いて、class B 型β-ラクタマーゼ検出のための IPM 濃度を設定した。

### A. 研究目的

日本では今でも感染症の治療薬として 130 種類以上の抗菌薬が使える状況下にある。中でもβ-ラクタム系薬が全体の 50%強を占める。この背景には、β-ラクタム系薬が 6-APA や 7-ACA を原料とする半合成法の確立や側鎖の置換が比較的容易であり、かつ細胞壁という細菌固有の構成成分を標的とするなどそれ自身の安全性が高いことが大きな理由でもある。しかし、その反面、注射用、経口用β-ラクタム薬など共に類似薬の使用頻度が増え、感染症の起原菌が類似薬に曝される頻度も増えるため、耐性菌が選択される確率も増すと考えられる。事実、我々が予期した以上にβ-ラクタム薬耐性の主因となるβ-ラクタマーゼの量的・質的変異菌や新たなβ-ラクタマーゼによる耐性菌が出現してきている。このような背景のもと、耐性菌の迅速診断は、耐性菌による感染症の防止は勿論のこと医療現場における耐性菌の汚染と拡散防止の観点からも重要となる。平成 9 年度から平成 11 年度にわたり ESBL 産生菌を中心にしたβ-ラクタマーゼ産生菌の迅速診断法について検討したので報告する。

### B. 研究方法・研究成果

#### 1. 抗菌薬からみた ESBL 産生菌の識別

##### (1) 研究方法

欧米の研究者から分与を受けた当研究室保存の *E. coli* TEM-1、TEM-3、TEM-5、TEM-6、TEM-7、TEM-8、TEM-9、TEM-10、TEM-12、TEM-26、TEM-50、*E. coli* SHV-1、SHV-3、SHV-5 および、東邦大学医学部微生物学教室 石井良和博士より分与を受けた *E. coli* Tobo-1、さらに、我々が分離した Kit-1 を

ESBL 産生の標準株としてそれぞれ使用した

試験に用いた抗菌薬、ampicillin、cefepime、cefminox (ABPC、CFPM、CMNX; 明治製薬)、clavulanic acid (CVA; スミスクライン ビーチヤム)、piperacillin (PIPC; 富山化学)、ccfotaxime (CTX; ヘキスト マリオン ルセル)、ceftazidime (CAZ; 田辺製薬)、cefmetazole、cefepodoxime (CMZ、CPDX; 三共)、aztreonam (AZT; エーザイ)、imipenem (IPM; 萬有製薬)は、それぞれの販売元から原末の分与を受け、使用直前に溶解して使用した。

最小発育阻止濃度 (minimal inhibitory concentration、MIC) の測定は、日本化学療法学会標準法による寒天平板希釈法に準じて行った。

β-ラクタマーゼをコードする遺伝子の分類は、予めそれぞれの遺伝子の DNA の塩基配列を参照として独自に作成したプライマーを用いて行った。

##### (2) 研究成果

#### 1) TEM 及び SHV 型 ESBL 産生菌に対する抗菌力

欧米で分離された TEM-1、SHV-1 及びこれら元株由来の ESBL 産生 *E. coli* 14 株に対する各β-ラクタム系薬の MIC を求めた (表 1)。使用した菌株に対する ABPC 及び PIPC の MIC は  $\geq 128 \mu\text{g/ml}$  であり、被験菌は ABPC 及び PIPC に対して共に高度耐性を示すと分かる。これら ABPC の MIC は、CVA を添加することにより 2-3 管以上の MIC の低下が見られた。CTX の MIC は TEM-6、TEM-7、TEM-10、TEM-12 及び TEM-50 に対して元株である TEM-1 及び SHV-1 とほぼ同程度、CAZ の MIC は明らかに元株に比べ高い傾向を示した。また、CPDX の MIC はいずれの ESBL 産生菌に対しても  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  を示した。一方、CMZ、CMNX の MIC はいずれの ESBL 産生菌に対しても  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$  の値を示した。さらにカルバペネム系薬である IPM の MIC は、被験菌す

表1 ESBL産生菌に対するβ-ラクタム薬の抗菌活性

菌種	β-ラクタマーゼ	ABPC	ABPC/ CVA	PIPC	CTX	CAZ	CFPM	CPDX	CMZ	CMNX	IPM
<i>E. coli</i>	TEM-1	>128	4	>128	0.06	0.25	0.06	0.5	1	0.5	0.25
<i>K. pneumoniae</i>	TEM-3	>128	4	>128	16	16	1	128	0.5	0.5	0.125
<i>K. pneumoniae</i>	TEM-5	>128	8	>128	0.06	0.25	0.06	0.5	0.5	0.5	0.125
<i>E. coli</i>	TEM-8	>128	4	128	1	128	2	16	1	0.5	0.125
<i>K. pneumoniae</i>	TEM-9	>128	8	>128	0.06	0.25	0.06	0.5	1	0.5	0.125
<i>E. coli</i>	TEM-12	>128	4	32	0.125	4	0.25	0.5	1	0.5	0.125
<i>K. pneumoniae</i>	TEM-24	>128	4	>128	>128	2	4	>128	1	0.5	0.125
<i>E. coli</i>	TEM-26	8	4	2	0.06	0.25	≤0.03	0.5	2	0.5	0.125
<i>E. coli</i>	SHV-1	>128	8	>128	0.125	0.5	0.25	1	1	0.5	0.25
<i>E. coli</i>	SHV-3	>128	4	>128	16	128	2	128	0.5	0.5	0.125
<i>E. coli</i>	SHV-5	>128	4	>128	16	>128	4	128	1	0.5	1
<i>E. coli</i>	SHV-6	16	4	2	0.06	0.125	≤0.03	0.5	1	0.5	1
<i>E. coli</i> ML4901		4	2	1	0.06	0.125	≤0.03	0.25	0.5	0.5	0.125

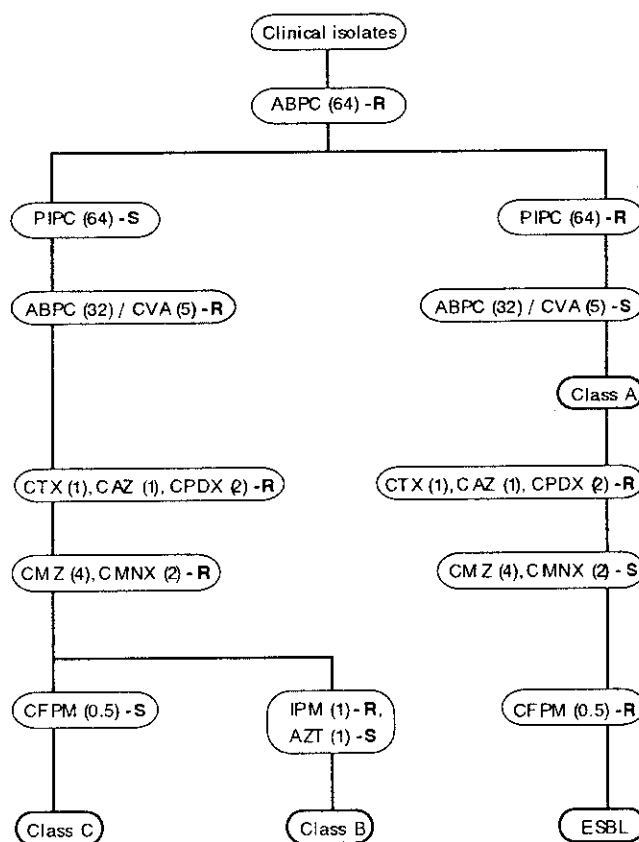
べてに対して ML4901 と同等であった。対照とした class A 型で TEM 型β-ラクタマーゼを産生する 6 株は、ABPC 及び PIPC に対して高度耐性、ABPC に CVA (5μg/ml) を添加により ABPC 単独の MIC の 1/4 以下となった。またこれら TEM 型酵素を産生する 6 株はその他の抗菌薬に対して感受性を示した。

本邦で分離された ESBL (Kit-1 型や Toho-1 型) 産生菌は、1 株を除き CTX の MIC が CAZ の MIC よりも明らかに高い特徴を示した。また、CPDX の MIC は ≥64 μg/ml であり、かつセファマイシン系薬及び IPM は、*E. coli* ML4901 及び ML4953 に対して感受性を示した。同様に class C 型β-ラクタマーゼ産生菌に対する ABPC の MIC は ≥128 μg/ml であり、CVA の添加においても ABPC の MIC は 64 μg/ml、PIPC の MIC は 8-16 μg/ml であり、class A 型酵素産生菌に対する PIPC の MIC ≥64 μg/ml に比べ低い結果であった。また、CTX、CAZ 及び CPDX の MIC は KU924 を除くと比較的高く、CMZ 及び CMNX 同様、高い値を示した。これに対して CFPM は、IPM 同様優れた抗菌力を示し、その MIC は ML4901 に対する MIC とほぼ同程度であった。KU924 株は PIPC 8 μg/ml、CAZ 1 μg/ml、CPDX 8 μg/ml の MIC を示すことから、class C 型酵素産生菌と推定される。

## 2) ESBL 産生菌の検出手順

以上の結果をまとめて、臨床分離の *E. coli*、*K. pneumoniae* から ESBL 産生菌の検出手順をチャート化し、図 1 に示した。

まず、被験菌に対する ABPC の MIC が ≥128 μg/ml 又は PIPC の MIC が ≥128 μg/ml の菌株か否かを判断する。さらに CVA (5 μg/ml) を添加により ABPC 又は PIPC の MIC がそれぞれの単独の MIC に比べ、



( )、薬剤濃度；-R、耐性；-S、感受性

図1 ESBL産生菌の検出手順

少なくとも 1/4 以上低下することが確認できれば、class A 型酵素産生菌とほぼ確定できる。次に、CTX (1 μg/ml)、CAZ (1 μg/ml)、CPDX (2 μg/ml) のいずれかに対して耐性を示し、CMZ (4 μg/ml)、CMNX (2 μg/ml) に対して感受性、CFPM (0.5 μg/ml) に耐性

であれば ESBL 産生菌の可能性が強い。他方、ABPC の MIC が  $\geq 128 \mu\text{g/ml}$  であっても CVA の影響が少なく、しかも PIPC の MIC が  $\leq 64 \mu\text{g/ml}$  であれば、class C 型酵素産生菌と強く示唆される。また、class B 型酵素産生菌の場合は、IPM ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) に耐性を示す株から検出できる。以上、各  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌は、ABPC、PIPC あるいは CMZ、CMNX、CFPM 及び IPM に対する感受性を検討することにより酵素型を十分確定することが出来る。

## 2. P/CaseTEST による $\beta$ -ラクタマーゼの型別

### (1) 研究方法

対象とした菌株は、何らかの  $\beta$ -ラクタマーゼを産生する臨床分離 *E. coli* (87 株) に限定した。まず、 $\beta$ -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。

$\beta$ -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。

### (2) 研究結果

#### 1) $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *E. coli* の薬剤感受性と産生酵素

$\beta$ -ラクタマーゼ産生 *E. coli* 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 ( $> 128 \mu\text{g/ml}$ )、PIPC ( $> 64 \mu\text{g/ml}$ ) 耐性であるが CVA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) 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 ( $> 128 \mu\text{g/ml}$ )、PIPC ( $> 64 \mu\text{g/ml}$ ) 耐性であるが CVA ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) 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  $32-64 \mu\text{g/ml}$  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  $1-2 \mu\text{g/ml}$  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  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBLs を除く) 産生菌 22 株、class A  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBLs) 産生菌 21 株、class C  $\beta$ -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。

NCCLS ガイドラインによると、CPDX、CAZ、CTX、AZT、CTRX のいずれかに  $\text{MIC} \geq 2 \mu\text{g/ml}$  以上を示す *E. coli*、*K. pneumoniae* は ESBL 産生を疑うとなっているが、*E. coli* 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  $\beta$ -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) P/CaseTEST による $\beta$ -ラクタマーゼの分別検出

P/CaseTEST に  $\beta$ -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た。その結果、P/CaseTEST により class A  $\beta$ -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  $\beta$ -ラクタマーゼ) として 100% 同定可能であった。しかし、class C  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌では 35/37 (94.5%) が class C  $\beta$ -ラクタマーゼ/class A  $\beta$ -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  $\beta$ -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) P/CaseTEST の改良

Class C  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -ラクタマーゼによる偽陽性反応は完全に抑制された。しかもこの濃度の MCIPC では class A  $\beta$ -ラクタマーゼの陽性反応には影響しなかった。

#### 4) 改良型 P/CaseTEST による迅速診断

$\beta$ -ラクタマーゼ産生 *E. coli* 87 株について改良型 P/CaseTEST 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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。



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 <sup>1)</sup>			検査株数	CFPMの MIC <sup>2)</sup>	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	≥2	+	-	20 (95)
○	*	○	1		+	+	1

<sup>1)</sup> UV法により決定した

<sup>2)</sup> cefepimeのMIC(μg/ml)

### 3. Class B型酵素産生菌の検出法

#### (1) 研究方法

臨床分離の *Pseudomonas aeruginosa* (85株、4 μg/ml以上), *Serratia marcescens* (20株、4 μg/ml以上) および *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* (11株、0.5 μg/ml以上) の各菌株を集め、その中から class B型酵素の検出を検討した。それぞれの菌種は、IPM に対する耐性検出のための選択濃度を1, 4, 8, 16, 32, 64 μg/ml を中心に各菌種で再度設定し、検討した。次いで、各選択濃度にて増殖した各菌株について、PCR法にて遺伝子の確認を行い、class B型酵素産生遺伝子を検出するための濃度を決めた。

#### (2) 研究成果

*P. aeruginosa* 85株は、IPM 4 μg/ml 以上の菌株であったが MIC 値で 8 μg/ml 6株、16 μg/ml 33株、32 μg/ml 29株、64 μg/ml 11株、>64 μg/ml 2株であった。

*S. marcescens* 20株は、4 μg/ml 20株、8 μg/ml 20株、16 μg/ml 16株、32 μg/ml 16株であった。

*E. coli* (8株), *K. pneumoniae* (2株), *E. cloacae* (1株) は、共に 1 μg/ml 4株、2 μg/ml 3株、4 μg/ml

3株であった。

これらの菌株について、PCR法にて class B型酵素産生遺伝子の検出の有無を検討した。その結果、*P. aeruginosa* では、IPM >64 μg/ml を示した2株、*S. marcescens* では IPM >8 μg/ml を示した16株、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* では IPM >1 μg/ml を示した3株全てにおいて遺伝子の増幅が見とめられた。しかし、各菌種でここに示した IPM の濃度以下の場合、PCRによる遺伝子の増幅はみられなかった(表3)。この結果から、class B型酵素産生を検出するための濃度は、*P. aeruginosa* では IPM 64 μg/ml, *S. marcescens* では 8 μg/ml, *E. coli*, *K. pneumoniae* などで 1 μg/ml の薬剤含有培地を用いると検査部でも容易に検出可能と考える。

### C. 考察

β-ラクタマーゼsの class 分けの根拠は、酵素のアミノ酸配列の相同性からの分類であり、遺伝子の類似性を中心としたものである。ところが、同じ class に分類された酵素であっても、MICなどの表現型や基質特異性の結果には、違いが認められる。これ

表3 PCR法によるclass B産生遺伝子の検出

菌種	MIC(μg/ml)	検出株数
<i>P. aeruginosa</i>	≥64	2
<i>S. marcescens</i>	≥16	16
Enterobacteriaceae	≥2	3

に対して class A 型、class C 型及び class B 型酵素間では、それぞれペニシリン系薬、セフェム系薬及びペニシリン系/セフェム系/カルバペネム系薬を加水分解するなどの違いを上手に利用することにより、各 $\beta$ -ラクタム系薬の MIC も異なる。*Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *E. cloacae* のようなグラム陰性菌は、多量の class C 型酵素産生菌であること、及び同時に class A 型酵素を保有している点を十分承知しておかないと ESBL 産生菌と判断を見誤ることが多い。

さらに、P/CaseTEST 用いた $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *E. coli* の $\beta$ -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 P/CaseTEST では、class C $\beta$ -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 P/CaseTEST は、これまで検査室における $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 P/CaseTEST では、最近 *Serratia marcescens* や *P. aeruginosa* からの検出頻度が多くなりつつある class B $\beta$ -ラクタマーゼの検出ができないことである。今後は、最適な class B 酵素阻害剤の探索を行い、P/CaseTEST に応用可能か否か検討することとしている。

#### D. 研究発表

1. Jones, R. N., Baquero, F. Privitera, G. Inoue, M. and Wiedemann, B. Inducible  $\beta$ -lactamase-mediated

resistance to third-generation cephalosporins. Clin. Microbiol. Infect. 3:7-20, 1997.

2. Chon, Y., Lee, K., Okamoto, R. and Inoue, M. : Characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactam hydrolyzing activity of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains. Yonsei Med. J. 29: 477-491, 1997.

3. Inoue, M., Kuga, A., Shimauchi, C., Yano, H. and Okamoto, R. : Why do antimicrobial agents become ineffectual? Yonsei Med. J. 39: 502-513, 1998.

4. 久我明男、矢野寿一、岡本了一、佐藤優子、宮田愛子、井上松久 : Extended-spectrum  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌に対する $\beta$ -ラクタム系薬の抗菌力の比較. Jpn. J. Antibiotics 52: 585-594, 1999.

5. Iyobe, S., Watanabe, M., Mitsuhashi, S. and Inoue, M. : Estimation of outer membrane permeability of carbapenem antibiotics to *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Chemother. 5: 168-170, 1999.

6. Matsumoto, Y. and Inoue, M. : Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:307-13, 1999.

7. Yano, H., Kuga, A., Irinoda, K., Okamoto, R., Kobayashi, T. and Inoue, M. : Presence of genes for  $\beta$ -lactamases of two different classes on a single plasmid from a clinical isolate of *Serratia marcescens*. J. Antibiotics 52:1135-1139, 1999.

8. Yano, H., Suetake, M., Kuga, A., Irinoda, K., Okamoto, R., Kobayashi, T. and Inoue, M. : Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. J. Clin. Microb. 38: 625-629, 2000

9. Kuga, A., Okamoto, R. and Inoue, M. : ampR gene mutations that greatly increase class C  $\beta$ -lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. 44; 2000. (in press)

分担研究報告書

β-ラクタム、マクロライドおよびホスホマイシン耐性菌の迅速検出法、  
および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 (平成9・10年度) 千葉大学薬学部微生物薬品化学 教授  
小原康治 (平成11年度) 千葉大学薬学部微生物薬品化学 助教授

研究要旨

ルシフェラーゼ発光による菌体内ATP量より菌増殖阻害を判定する方法(ATP法)の改良を行い、MIC測定時間を従来法(微量液体希釈法)の5分の1以下(約3.5時間)に短縮する迅速MIC測定法を考案した。β-ラクタマーゼの各クラスに対する特異的阻害剤(clavulanic acid、新monobactam誘導体、新carbapenem誘導体)のABPC抗菌力(MIC)に対する併用効果から、被験菌の生産するβ-ラクタマーゼをクラスA/D、クラスB、クラスCへのクラス鑑別を簡便・迅速に行う方法を考案した。臨床分離グラム陰性菌を対象に、耐性遺伝子プライマーを用いてマクロライド耐性遺伝子、ホスホマイシン耐性遺伝子の保持菌を迅速かつ簡便に検出する方法を考案した。これらの方法では耐性機序列の検出が可能であり、新規耐性遺伝子も発見した。

研究協力者 小原康治 (平成9・10年度)  
千葉大学薬学部 助教授  
澤井哲夫 (平成11年度)  
千葉大学薬学部 教授

A. 研究目的

β-ラクタマーゼは微生物が一般的に生産するβ-ラクタム剤加水分解酵素であり、病原細菌の主要なβ-ラクタム剤耐性機構である。クラスAおよびクラスCβ-ラクタマーゼ生産による耐性菌に加え、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼによる広域β-ラクタム剤耐性菌が増加している。さらにクラスBβ-ラクタマーゼ生産により多くのβ-ラクタム剤に耐性化した新耐性菌が増加しつつある。これらβ-ラクタム剤耐性菌に対する適切なβ-ラクタム剤選択には、薬剤感受性の迅速測定と共に菌の生産するβ-ラクタマーゼのクラス鑑別が必要である。平成9年度では菌体内ATP量により菌増殖を測定するATP法の改良によるMIC測定の迅速化を行い、平成10年度では各クラスβ-ラクタマーゼに対する特異的阻害剤の利用により、耐性菌の生産するβ-ラクタマーゼのクラス鑑別を臨床現場でも容易に実施出来る方法を検討した。

耐性菌増加と新抗生物質発見の困難さにより、

抗生物質の威力はやや低迷しているが、その中でもマクロライド抗生物質とホスホマイシンは再評価されている抗生物質である。マクロライドは難治性疾患への有効性や抗菌作用以外の有用な新生理活性が知られ、またホスホマイシンは大腸菌0-157に有効な抗菌剤の一つである。これら抗生物質に対しても耐性菌が出現しつつあり、それぞれ複数の耐性機構が知られている。耐性菌の迅速な検出とその耐性機構の判別は臨床的にも重要な情報であるだけでなく、今後の耐性菌抑制の基礎となるものであり、平成11年度はマクロライド及びホスホマイシン耐性菌の研究を実施した。

B. 研究方法

迅速MIC測定法の検討では、使用菌株として *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa* の各NCCLS由来標準菌株 (*E. coli* 20株、*S. aureus* 30株、*P. aeruginosa* 20株)を用いた。ATP法(1)による発光量の測定はルミテスター K100 又はML3000を用いて行った。現行のMIC測定法として化療法による微量液体希釈法を用いた。ATP法による薬剤感受性の判定はATPインデックスにより行った。ATPインデックス(%) = 薬剤含有培地の発光量 / 非含有培地の発光量 × 100 とした。ATPイ

ンデックスが40%以下を菌増殖阻止と判定した。  
β-ラクタム剤はPIPC、CAZ、CEZ、AZT、CFS及びIPM/CSを用いた。

各クラスβ-ラクタマーゼに特異的な酵素阻害剤を利用するβ-ラクタマーゼのクラス鑑別法にはclavulanic acid (CVA、oxapenem)、Syn2161(monobactam誘導体)、J110.44I(carbapenem誘導体)の3種を用い、ABPCとの併用効果より鑑別を行った。MIC測定は微量液体希釈法で行った。Syn2161はクラスCβ-ラクタマーゼ、J110.44IはクラスBにそれぞれ特異的な新阻害剤である。Syn2161は大鵬薬品工業(株)、J110.44Iは萬有製薬(株)の協力により提供された。

マクロライド耐性遺伝子としてはエリスロマイシン・エステラーゼ遺伝子(ereA、ereB)、マクロライド2'-リン酸化酵素(mphA、mphB)、リボソーム・メチラーゼ遺伝子(ermA、ermB、ermC)を用いた。ホスホマイシン(FOM)耐性遺伝子としてはグラム陰性菌由来のFOM:グルタチオン(GSH)付加酵素遺伝子(fosA)を用いた。これら遺伝子の各プライマーを用いて、PCRにより耐性遺伝子を検出した。各遺伝子に支配される薬剤不活性化酵素の活性測定は、超音波破碎菌体の超遠心上清を酵素試料として、薬剤・補酵素と共に反応後、残存薬剤量をBacillus subtilis ATCC6633を用いてbioassayにより測定した。

### C. 研究結果

**薬剤耐性菌の迅速検出法:** MIC測定 of 迅速化を目的としてATP法の適用を検討した。*E. coli*、*S. aureus*の標準菌株を用いた薬剤感受性評価では、ATP法と現行法(微量液体希釈法)の両法で感受性/耐性の鑑別はよく一致した。しかし、*P. aeruginosa*ではPIPCとIPM/CSで不一致が観察された。その原因はフェラメント菌体にあった。フェラメント菌体は薬剤による増殖阻害を十分に受けているが、比較的に高いATP量を保持しているため、ATP法では正常菌体と誤認されることが分かった。この誤差原因を除去するため、フェラメント菌体ATPを特異的に消去する方法を検討した。その結果、0.5%AMPD(2-amino-2-methyl-1,3-propanediol)によりフェラメント菌体を選択的に溶菌し、溶出ATPをAPDaseで消去する方法を考案した。この前処理を加えた新規ATP法では、感受性/耐性の鑑別は現行法と完全に一致した。図1は感受性(S)と耐性(R)の鑑別で、不一致率の最も高かった*P. aeruginosa*について、現行法と従来のATP法および新規ATP法との相関を図式化したものである。

表1. 使用菌株とその産生するβ-ラクタマーゼ

β-lactamase	Strain
Class A	<i>E. coli</i> ML1410/RGN823
	<i>E. coli</i> ML1410/RGN14
	<i>K. pneumoniae</i> GN69
	<i>P. mirabilis</i> N29
	<i>P. vulgaris</i> GN76/C1
Class B	<i>E. coli</i> ML1410/RDK4
Class C	<i>E. coli</i> 255
	<i>C. freundii</i> GN346
	<i>E. cloacae</i> P99
	<i>E. cloacae</i> 363
	<i>M. morgani</i> 1510
Class D	<i>E. coli</i> ML1410/RGN238
Extended-spectrum Class A (Toho-1 ESBL)	<i>E. coli</i> ML1410/pMTY010
Extended-spectrum Class C	<i>E. cloacae</i> GC1
	<i>C. freundii</i> GC3
Production of two kinds of β-lactamase (Class A and C)	<i>C. freundii</i> GN346/RGN823

新規ATP法の操作概要は次のとおりである。  
3時間培養菌液100 μlに0.5%AMPD、0.3U/ml APDase、5mMEDTA、25mM Tricine(pH 7.75)を加え30分間室温放置、次いでATP抽出試薬・発光試薬を各50 μl添加し、発光量を測定する。菌培養開始からMIC判定までの所要時間は約3時間30分であり、微量液体希釈法の5分の以下に短縮可能である。

**β-ラクタマーゼのクラス鑑別法:** 表1に示したクラスA・B・C・Dの各生産菌、わが国で検出される基質特異性拡張型クラスA(Toho-1)生産菌、我々が臨床分離した基質特異性拡張型クラスCβ-ラクタマーゼ生産菌、及びクラスAとクラスCの両β-ラクタマーゼ生産菌、計16菌株を用

図1. 緑膿菌のβ-ラクタム剤感受性：従来法とATP法の相関

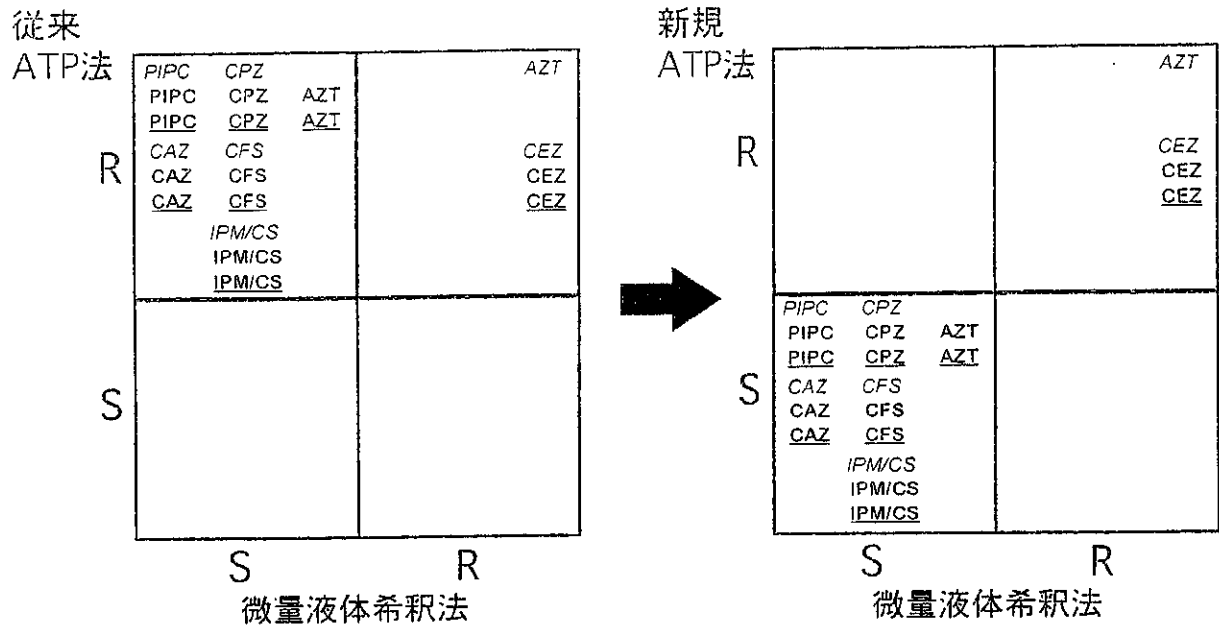
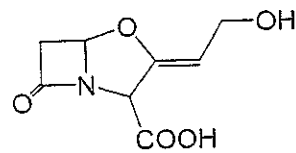
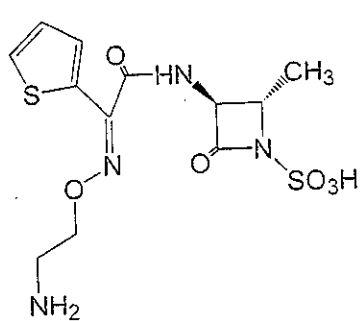


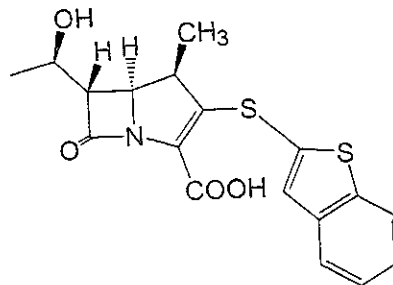
図2. β-ラクタマーゼ阻害剤の化学構造



Clavulanic acid (CVA)



Syn-2161



J-110,441

いた。併用A B P CのM I C値に及ぼす3種阻害剤(図2)の効果から、菌の生産するβ-ラクタマーゼのクラスを鑑別することを検討した。各阻害剤は弱い抗菌作用を持つため、阻害剤M I Cの1/5 ~ 1/20濃度の範囲で阻害剤最適濃度を検討し、C V AとJ110.441は10 μg/ml、Syn2161は20 μg/mlとした。

クラスA~D生産菌に対するA B P CのM I Cに及ぼす3種阻害剤併用効果を表2に示す。この結果より、クラスA~Cの鑑別が可能である。クラスDはクラス分類初期にはクラスAに属し、酵素化学的性質で類似性が高く、この方法では両者は区別できなかつた。但し、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る。P. vulgarisとM. morganiではJ110.441に対する感受性が他の同クラス酵素と異なるが、この2菌種酵素はやや特異な性質を持つβ-ラクタマーゼとして知られている。基質特異性拡張型酵素及びクラスA/C複合生産菌に対する併用効果(表3)では、クラスA拡張型はクラスAと同様のパターンを示し、その他はC V Aに弱い感受性を示す以外は、併用効果が観察されなかつた。以上の結果に基づく各β-ラクタマーゼ生産菌に対する阻害剤効果のパターン(表4)が得られた。

マクロライド、ホスホマイシン耐性菌の耐性機序別迅速測定法:マクロライド耐性遺伝子に関しては、臨床分離E. coli 500株のうち、3株でereB (564 bp)を検出したが、感受性標準株(BM 694/pAT63)では検出されなかつた(図3A)。mphA (837 bp)については臨床分離菌3株で検出したが、感受性標準株(W3110rif/RP1)では検出されなかつた(図3B)。

ホスホマイシン耐性遺伝子については、Rahnella aquatilisの臨床分離菌1菌株でfosAを検出し塩基配列で確認した。Serratia marcescensの臨床分離株よりfosA保持菌1菌株を検出した。更にG S H依存性の新規薬剤不活化酵素遺伝子(fosX)を発見した。

#### D. 考察

表4に要約した各クラスのβ-ラクタマーゼ生産菌に対する3阻害剤の併用効果より、クラスA/D、クラスB、クラスCの鑑別が可能である。クラスA拡張型はクラスAと区別出来ないが、一般的に行われるオキシミノ系β-ラクタム剤のM I C値を参照すれば両者の区別は容易と考えられる。拡張型クラスCとクラスA/C複合生産の区別も出来ないが、現時点では拡張型クラスC生産菌の臨床分離頻度は低いため、このパターンを

示す高度耐性菌は複合生産による耐性菌の確率が高いと判断される。本鑑別法でのM I C測定は、一般医療機関の設備を考慮して微量液体希釈法で行った。これをA T P法で行ったところ、同一の結果が得られている。この迅速法の適用により3時間30分程度で鑑別結果が得られた。

耐性機構の明らかにされた薬剤耐性遺伝子をプローブとする検出法は、耐性機序別の薬剤耐性菌の鑑別が可能である。本研究で用いた検出法を臨床分離株に適用し、わが国でmphやfos遺伝子の増加が推測される。

#### E. 結論

細菌菌体内A T P量をルシフェラーゼ発光により定量し、細菌増殖を測定するA T P法の改良により、β-ラクタム剤のM I C測定時間を現行法(微量液体希釈法)の5分の1以下の約3時間30分に迅速化できた。各クラスβ-ラクタマーゼの特異的阻害剤を用い、クラスA/D、クラスB、クラスCの鑑別が可能である。

グラム陰性菌のマクロライド及びホスホマイシン耐性菌は、各薬剤耐性遺伝子プライマーを用いるP C R法により迅速な検出が可能である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hattori N., Nakajima M., O'Hara K. and Sawai T. Novel antibiotic susceptibility test by the ATP-bioluminescence method using filamentous cell treatment. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1406-1411 (1998)
2. O'Hara K., Chen J., Shigenobu F., Nakamura A., Taniguchi K., Shimojima M., Ida H., Yoshikawa E., Tsuboi I., Mizuoka K., & Sawai T.: Appearance of fosfomycin resistant Rahnella aquatilis clinically isolated in Japan. Microbios 95: 109-115 (1998)
3. Taniguchi K., Nakamura A., Tsurubuchi K., Ishii A., O'Hara K. and Sawai T. Identification of functional amino acids in macrolide 2'-phosphotransferase II. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2063-2065 (1999)
4. 澤井哲夫, 小原康治, 大沼雅江, 中村昭夫, 内藤泰代, 仲澤今日子. β-ラクタマーゼの酵素阻害剤によるクラス鑑別法の検討. 日化療会誌 48:101-106 (2000)

## 2. 学会発表

1. 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への応用（その5）MIC測定とその再現性の検討。日本化学療法学会雑誌、46, supplement-A 1998（第46回日本化学療法学会総会、講演要旨集）p.185、和歌山市、1998.6.4-5

2. 小原康治、中村昭夫、鶴淵和恵、仲澤今日子、都澤いずみ、水越聡子、石井亜紀、内藤泰代、谷口和夫、澤井哲夫：マクロライド抗生物質の新作用と耐性機構。第14回微生物シンポジウムー薬学領域における微生物研究とその応用面。講演要旨集p.12-15、新潟、1999.9.17-18。

3. 中村昭夫、都澤いずみ、陳佳、重信普律、清水正樹、小原康治、澤井哲夫：ホスホマイシンの新作用と耐性機構。第14回微生物シンポジウムー薬学領域における微生物研究とその応用面。講演要旨集p.12-15、新潟、1999.9.17-18。

4. 仲澤今日子、中村昭夫、大沼雅江、内藤泰代、小原康治、澤井哲夫：酵素阻害剤によるβ-ラクタマーゼのクラス鑑別法の検討。日本薬学会第200年会講演要旨集3、岐阜、2000.3.29-31

表2. Ampicillinと3種阻害剤の併用効果

β-lactamase Class	Strain	MIC of ABPC (μg/ml)			
		0	CVA	Syn-2161	J-110,441
non	<i>E. coli</i> ML1410	6.3	3.1	3.1	3.1
A	<i>E. coli</i> ML1410/RGN823	> 800	12.5	>800	>800
	<i>E. coli</i> ML1410/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
B	<i>E. coli</i> ML1410/RDK4	25	12.5	25	3.1
C	<i>E. coli</i> 255	400	400	6.3	400
	<i>C. freundii</i> GN346	800	200	1.6	400
	<i>E. cloacae</i> P99	> 800	800	12.5	800
	<i>E. cloacae</i> 363	800	400	3.1	400
	<i>M. morgani</i> 1510	800	400	1.6	6.3
D	<i>E. coli</i> ML1410/RGN238	800	25	800	800

The inhibitor concentrations were fixed as follows: CVA; 10 μg/ml, Syn-2161; 20 μg/ml, J-110,441; 10 μg/ml.

表3. 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌およびクラスA/C複合産生菌に対する3種阻害剤併用効果

β-Lactamase	Strain	MIC of ABPC (μg/ml)			
		0	CVA	Syn-2161	J-110,441
Toho-1 ESBL	<i>E. coli</i> ML1410/pMTY010	>800	6.3	>800	>800
Extended-spectrum class C	<i>E. cloacae</i> GC1	>800	800	>800	>800
	<i>C. freundii</i> GC3	>800	800	>800	>800
Class A/C simultaneous production	<i>C. freundii</i> GN346/RGN823	>800	400	>800	>800

注：阻害剤濃度は表2を参照。

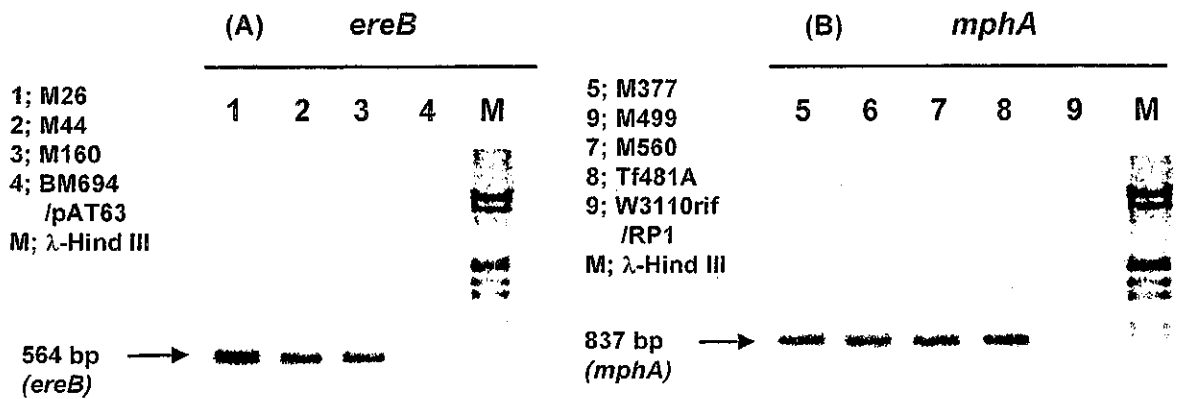
表 4. 3 種阻害剤の阻害パターン

$\beta$ -Lactamase production	Inhibitor effect*		
	CVA	Syn-2161	J-110, 441
Class A	++	-	-(v) **
Class B	+	-	++
Class C	+	++	-(v) **
Class D	++	-	-
Toho-1 ESBL	++	-	-
Extended-spectrum Class C	+	-	-
Class A/C production	+	-	-

\*The degree of effect was expressed as follows; significant effect (++) , weak effect(+), no effect(-).

\*\* varied according to the species.

図 3. エリスロマイシン耐性遺伝子のPCR法による検出



Primer *ereB* :

5'- TCTTTACCTCCAAGTATGAATGGT -3'

3'- CATATAATCATCACC AATGGCA -5'

Primer *mphA* :

5'- AACACCCTGAACCCAAGGGACG -3'

3'- CTTACATCCGGATTTCGCTCGA -5'



# 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

### β-ラクタマーゼの迅速検出法の確立に関する研究

分担研究者 山口恵三 東邦大学医学部 微生物学教室教授

研究協力者 馬 リン、大野 章、石井良和 東邦大学医学部 微生物学教室

研究要旨 検体からβ-ラクタマーゼを直接検出する方法を開発することを目的に検討を行った。まず、現在最も検出感度が良いとされている、PCR 法を用いて検体からβ-ラクタマーゼを産生する遺伝子を検出する方法を確立した。この方法での検出感度は  $10^2$  cfu/ml 程度であった。次に喀痰から直接β-ラクタマーゼを酵素学的に検出することを目的として、β-ラクタマーゼ活性の測定方法を確立した。この方法での検出限界は  $10^4$  cfu/mL であった。さらに、酵素学的方法を用いてβ-ラクタマーゼの分類を行うための方法の確立を試みた。この方法はβ-ラクタマーゼ阻害剤と基質となるβ-ラクタム系抗菌薬の組み合わせを利用して行うもので、簡便に多くのβ-ラクタマーゼを検出して分類することが可能となるものである。これらの方法を検査の目的によって使い分けることにより、迅速、簡便且つ高感度で検体からβ-ラクタマーゼを検出したり、簡便にβ-ラクタマーゼの型別を行うことが可能になるものと思われた。

#### 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。これまでに喀痰からの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と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。

一方、β-ラクタマーゼの型別を簡単に行うことが可能であれば様々な疫学調査のための道具としての利用価値が高いと考えられる。現在までに市販されているβ-ラクタマーゼ検出キットとしては、ペニシリン系抗菌薬を分解するタイプとセファロスポリン系抗菌薬を分解するタイプを分類することができるものが市販されているに過ぎず、疫学調査を行うために使う方法としては十分とは言えない。

私達は、検体から直接且つ迅速にβ-ラクタマーゼを検出する目的で PCR を用いた分子生物学的方法およびニトロセフィンを基

質として使用する酵素学的方法の検討を試みた。さらに、多種類のβ-ラクタマーゼを検出して分類する目的で酵素阻害剤と好適基質を組み合わせた酵素学的方法の確立を試みた。

#### B. 研究方法

##### I PCR 法による検出

##### 1. プライマーの設計

DDBJ に登録されている種々のβ-ラクタマーゼの遺伝子配列から TEM-1、Toho-1 などの各遺伝子に対するプライマーを作成した。なお、同時に複数のβ-ラクタマーゼ遺伝子を増幅することができるマルチプレックス PCR を実施することができる様にプライマーを設計し、常法にしたがって PCR 反応を行った。

##### 2. PCR 産物の検出方法

今回実施した方法は PCR で得られた断片に存在する塩基配列を有するプローブを製作し、予めメンブロンに固定し、PCR を実施して得られた産物をこのメンブロン上で DNA-DNA hybridization を行いシグナルを検出するものである(図 1)。当初は 20~30 mer 程度の合成 DNA をプローブとして使用する予定でいたが、プローブの分子量が小さすぎるため、ニトロセルロースメンブロンに

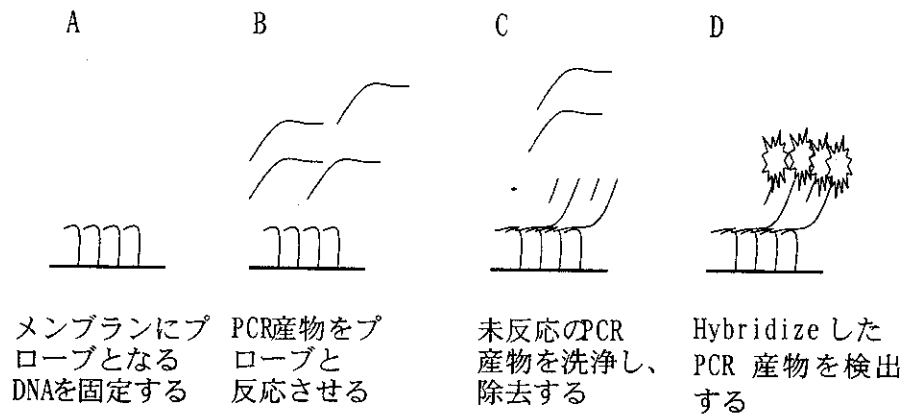


図1 検出方法の原理

もナイロンメンブランにも効率良く固定することができなかつた。したがって、PCRのプライマーは600bp以上のフラグメントを得ることができるように設計しておき、その内側に200bp程度のPCR産物が得られるようなプライマーをさらに設計した。そして、この内側のプライマーを使用して予め既知の遺伝子を増幅し、プローブとした。目的の検体に対しては外側のプライマーを用いてPCRを行った。なお、この外側のプライマーの5'末端には検出の目的でフルオレッセインをラベルし、検出にはECL検出キット(アマシャムファルマシアバイオテック、USA)を使用した(図2)。

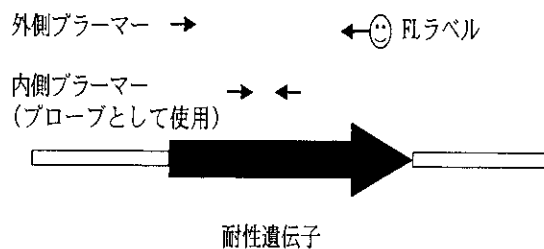


図2 プローブおよびプライマー作製の戦略

## II ニトロセフィンを基質として用いた酵素学的方法

### 1. 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200μLを1.5mLのマイクロチューブに移し、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)200μLを加えてホモジナイザー

でホモジネート後、1000,000G、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。

### 2. β-ラクタマーゼ活性の測定方法

酵素反応はBeckman自記吸光光度計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50μLを添加して、波長482nm、反応温度37℃で行った。

基質となるニトロセフィンは10μM、25μMおよび100μM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も同時に行った。

## III 酵素学的方法を用いたβ-ラクタマーゼの分類方法

本分類法の基本的戦略は図3に示すとおりβ-ラクタマーゼ阻害剤による阻害反応の特徴(表1)をもとにしている。今回は、産生するβ-ラクタマーゼの型が既に判明している菌株*Enterobacter cloacae* 908R(クラスC)、*Enterobacter cloacae* 723985(クラスC)、*Klebsiella pneumoniae* 722283(クラスA)および*Citrobacter koseri* 711493(クラスD)の各菌株を使用し、それらから精製した各種β-ラクタマーゼを用いて本実験系

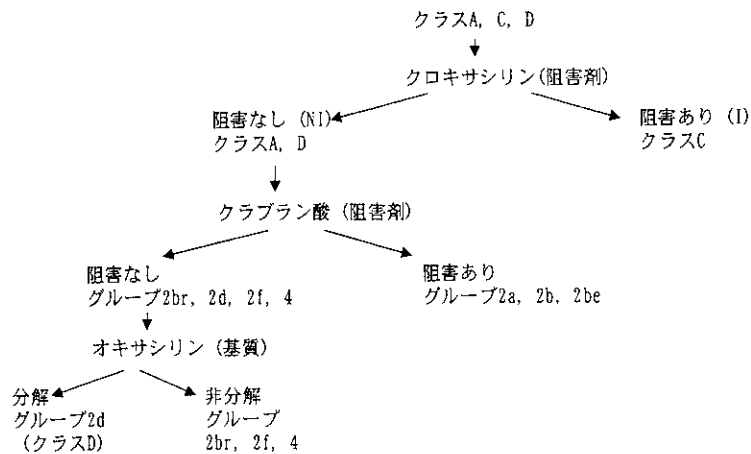


図3 β-ラクタマーゼ分類法の戦略

表-1 各種β-ラクタマーゼのクロキサシリンおよびクラバン酸に対するIC50値

Molecular クラス	Bush et al グループ	IC 50 (μM)	阻害剤		
			クロキサシリン IC 50 (μM) 未報告数/報告数	クラバン酸 IC 50 (μM) 未報告数/報告数	
Serine β-ラクタマーゼ	A	2a	>100, >1000	12 / 20	0.03, 0.07 6 / 20
		2b	4( SHV1) -13000	3 / 16	0.01, 0.2 4 / 16
		2be	<100, >10000	22 / 38	0.01, 0.4 1 / 38
		2br	13, >100	6 / 9	2, 50 0 / 9
		2c	7, >1000	2 / 15	0.005, 0.04 6 / 15
	C	2e	0.03, <2000	12 / 19	0.01, 0.6 2 / 19
		2f	120	2 / 3	0.28, 0.32, 14 0 / 3
		1	0.1, 0.0004 (0.3-100)*	9 / 32	>100 11 / 32
	D	2d	9, <10000	4 / 18	0.36, 8.4 1 / 18
		ND	4 >100 ( <0.001)**	1 / 7	19, >100 0 / 7
Metallo β-ラクタマーゼ	B	3	<1000	5 / 15	>10, >100 7 / 15

\*: クラスC7種類のβ-ラクタマーゼのうち最も高いIC50値

\*\* : このグループのβ-ラクタマーゼの中で報告された一つだけのIC50値

の評価を行った。菌株の培養には LB 培地を使用し、一夜培養後の各菌株から凍結・融解を3回繰り返すことでβ-ラクタマーゼを抽出した。これらの抽出液85μLを、1) 1mM ニトロセフィン 10μL + 400μM クロキサシリン 5μL、2) 1mM ニトロセフィン 10μL + 4mM クラバン酸 5μL、3) 50mM オキサシリン 10μL + 100mM Bromothymol Blue 5μLの基質と阻害剤を含む各溶液に添加し、室温でインキュベートして反応液の色調の変化を観察し、各阻害剤による阻害の有無から Ambler 分類のクラス A、C、D を判別し

た。なおこれらの反応は、96穴のマイクロタイタープレートを用いたwellの中で行った。

### C. 研究結果

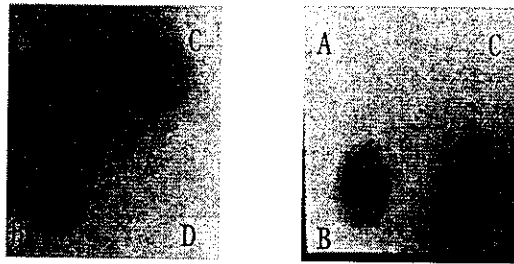
#### I PCR法を用いた検出方法

今回の方法による検出を試みたところ、きわめて良好な検出結果を得ることができた。

次にこの検出系を用いて実際に臨床検体から分離された *Escherichia coli* が保有する Toho 型β-ラクタマーゼおよび TEM 型

$\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の検出を試みた。この方法による結果は TEM 型の場合は Western blot による結果と一致し、Toho-型の場合は Western blot による結果と比較して感度が高かった。一方、TEM-および Toho-型いずれも、通常の PCR 法の検出方法である電気泳動による結果と一致した(図 4)。

さらに、多種類の  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子

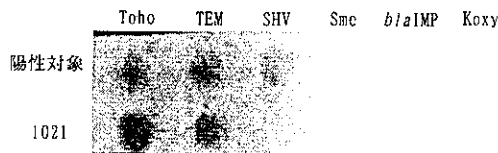


SHV型検出用システム Toho型検出用システム

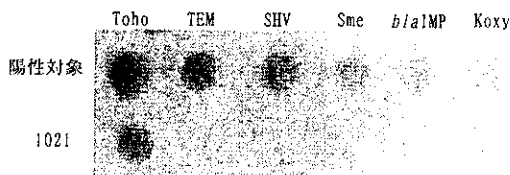
A: 陰性コントロール、B: 陽性コントロール  
C: SHV -1 陽性例、D: Toho -1 陽性

図 4 PCR による検出システムの一例

の検出を試みたが何れも良好な検出結果が得られた。なお、本方法による検出限界は  $\beta$ -ラクタマーゼをコードしている遺伝子のコピー数にも依存するがほぼ  $10^2$  cfu/ml 程度であった(図 5)。



*Escherichia coli* TUM1021を対象とした場合



*Escherichia coli* TUM1023を対象とした場合

図 5 臨床材料から分離された菌株からの PCR による検出例

## II ニトロセフィンを用いた酵素的検出方法 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  $50 \mu\text{L}$  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 *Enterococcus faecalis* が喀痰から抽出された溶液の  $\beta$ -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 6)。

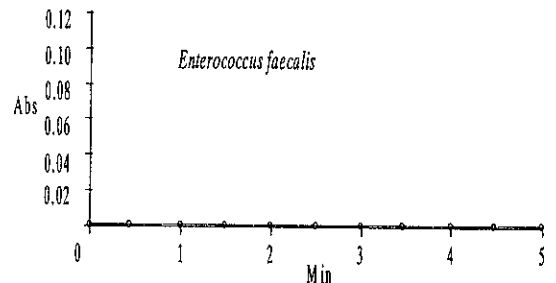
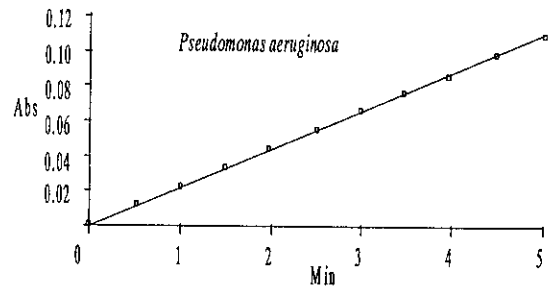


図 6 *Pseudomonas aeruginosa* と *Enterococcus faecalis* が検出された喀痰からの抽出液を  $100 \mu\text{M}$  ニトロセフィン溶液に反応させた場合の経時的吸光度変化

## 2. 喀痰中 $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 3)。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(図 7)。