

表3 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)	Vmax ( $\mu$ M/sec)	Km ( $\mu$ M)	Vmax/Km
A	10 <sup>5</sup>	0.132	37.3	0.0035
B	10 <sup>7</sup>	0.014	23.1	0.0006
C	10 <sup>7</sup>	0.071	39.2	0.0018
D	10 <sup>7</sup>	0.093	37.6	0.0025
E	10 <sup>6</sup>	0.165	33.7	0.0049
F	10 <sup>7</sup>	0.023	25.2	0.0009
G	10 <sup>6</sup>	0.059	24.1	0.0024
H	10 <sup>5</sup>	0.059	22.3	0.0026
I	10 <sup>6</sup>	0.011	17.4	0.0006
N	10 <sup>7</sup>	0.005	127.5	<0.0001

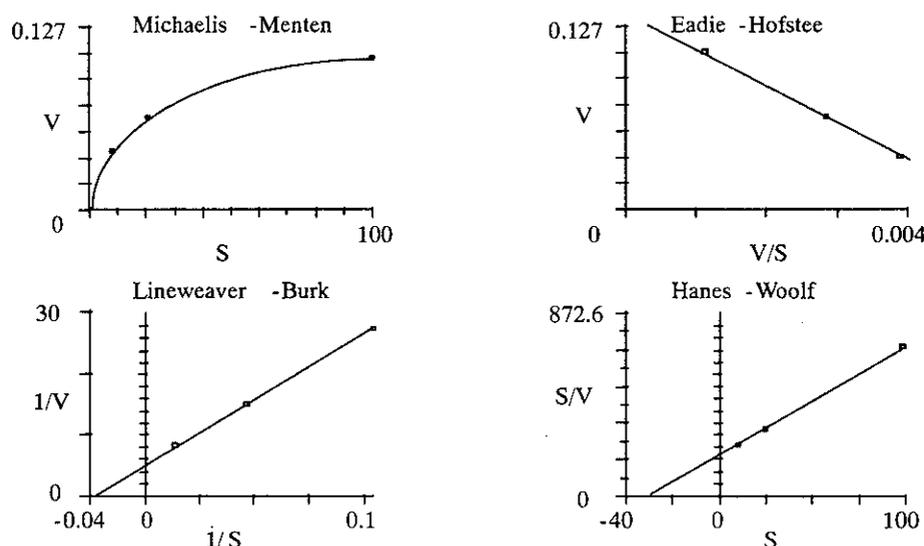


図7 酵素学的パラメーター算出時に行った各種プロット

### III 酵素学的方法を用いたβ-ラクタマーゼの分類方法

今回の検討結果を表4に示した。*E. cloacae* 908R および *E. cloacae* 723985 はクラスC、*K. pneumoniae* 722283 はクラスA、*C. koseri* 711493 はクラスAあるいはDの各β-ラクタマーゼを産生すると判定された。

### D. 考察

今回検討したPCRを用いた検出システムは多くのサンプルを一度に処理するためには極めて有用な方法であると考えられた。本年は高い感度による検出を試みたためECL

を用いたが、今後はECL以外の方法による検出法との組み合わせにより、より短時間で検出が可能で簡便な方法が確立されるものと考えられた。この方法を私たちは菌種の同定が困難であるStreptococciの同定に利用している。さらに、私たちは金コロイドで標識した抗体を用いる方法での検出法の確立を試みている。この方法の感度はECLによる検出法と比較するとかなり感度は落ちるが、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、VmaxおよびKm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。ただし、現在問題となっている基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼや複数の型の $\beta$ -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 $\beta$ -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考えている。今後は喀痰以外の検体中に存在する $\beta$ -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 $\beta$ -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。

今回の $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤と好適基質との組み合わせにより $\beta$ -ラクタマーゼの型別を行う方法では *C. koseri* 711493 の産生するクラス D $\beta$ -ラクタマーゼの判定に満足はいく結果が得られなかった。その理由として、*C. koseri* 711493 の産生する $\beta$ -ラクタマーゼの産生量が低かったことが挙げられる。今後さらに基質および pH 指示薬の組み合わせの変更、および濃度の最適化などを行うことにより、精度の高い実験系を確立することが可能になると考えられる。最終的には、ニトロセフィンのような入手が難しい試薬を使わずに検出感度が高い系を確立したいと考えている。また、今回は 4 菌株に絞って実験を実施したが今後はさらに多くの臨床分離株を使って実験を行う必要があると考えられた。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

喀痰から直接 $\beta$ -ラクタマーゼを検出することを目的に、緑膿菌から分離された喀痰を対象とした $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定方法を確立した。方法はニトロセフィンの分解能による色調変化を自記吸光光度計で測定し、酵素学的パラメータを求めることで行った。その結果喀痰中、 $10^6$  cfu/ml 以上の菌量で $\beta$ -ラクタマーゼが迅速に検出できた。

石井良和、馬 りん、山口恵三: 喀痰中 $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定方法の確立に関する検討、日本化学療法学会雑誌、47:619-622、1999

##### 2. 学会発表

1) 石井良和、馬 りん、平岡聖樹、大野 章、山口恵三: 喀痰中 $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定方法の確立に関する検討、第 71 回日本化学療法学会総会、東京、1996、6

喀痰から直接 $\beta$ -ラクタマーゼを検出することを目的に、緑膿菌から分離された喀痰を対象とした $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定方法を確立した。方法はニトロセフィンの分解能による色調変化を自記吸光光度計で測定し、酵素学的パラメータを求めることで行った。その結果喀痰中、 $10^6$  cfu/ml 以上の菌量で $\beta$ -ラクタマーゼが迅速に検出できた。

2) 馬 りん、石井良和、木村一博: 各種 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の迅速検出法の確立、第 114 回東邦医学会例会、東京、1999、7

各種 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の迅速検出法を確立する目的で、PCR 法と Southern blot を組み合わせた検出系を構築し、臨床材料から分離された菌株に応用した。その結果、Western blot として高い感度を得られ、タンパクレベルでは検出できなかった菌株からも $\beta$ -ラクタマーゼをコードする遺伝子が検出された。

#### IV. 総括研究報告書（平成10年度）

分担研究課題 及び 目 次 (平成10年度)

総括研究報告書 (平成10年度) -----	61
藤原 博	
分担研究報告書 (平成10年度)	
荒川 宜親 第三世代セフェム薬耐性菌の遺伝子解析と メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の簡易識別法の確立-----	65
池 康嘉 Vancomycin 耐性腸球菌 <i>E. faecalis</i> CB26 (Vancomycin高度耐性 Teicoplanin 低感受性) のVancomycin耐性遺伝子 (van) の分子遺伝学的研究-----	67
井上 松久 β-ラクタマーゼの分別検出法に関する研究-----	71
澤井 哲夫 病原細菌の生産するβ-ラクタマーゼのクラス鑑別法の考案-----	75
中江 太治 薬剤排出ポンプ発現による多剤耐性株の迅速検出法の開発-----	79
中島 良徳 マクロライド耐性機序と耐性菌の迅速検出法-----	83
堀田 國元 アミノグリコシド耐性菌の耐性機構の解析と迅速検出法に関する研究-----	87
山口 恵三 喀痰中β-ラクタマーゼ活性の測定方法の確立に関する検討-----	92
渡邊 邦友 嫌気性菌におけるカルバペネム耐性菌の迅速検出法の確立-----	97
渡辺 治雄 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性に影響を与える因子の 染色体マッピング-----	100

## 細菌の薬剤耐性の分子解析と耐性機序別迅速検出法に関する研究

主任研究者 藤原 博 (国立感染症研究所 細菌・血液製剤部)

### 研究要旨

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

### A. 研究目的

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

### B. 研究方法

#### 1. 国内分離菌からのESBL遺伝子の検出

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

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

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

#### 2. メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の識別法の確立

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

#### 3. 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性遺伝子

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

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

#### 4. 臨床分離黄色ブドウ球菌のマクロライド耐性

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

#### 5. 喀痰材料からの $\beta$ -ラクタマーゼの直接的検出

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

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

#### 6. PCaSETESTの改良による $\beta$ -ラクタマーゼのクラス分類

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

#### 7. 抗OprM抗体による薬剤汲み出し型耐性菌の検出

寒天固形培地上に生育した菌を、A6001cm=0.15の間になるよう50mMリン酸緩衝液pH7.0に浮遊した。この菌浮遊液を2倍希釈により連続的に希釈し、これを0.1%のSPSを含む緩衝液中で100 $^{\circ}$ C1分加熱した後、その各々の100 $\mu$ lを吸引によりメンブレン上に吸着させた。この膜を先に調成しておいた抗OprM抗体で75分間処理した後2次抗体を30分作用させ、30分間発色反応を行った。

#### 8. アルベカシン耐性MRSAの耐性遺伝子の検出

アルベカシン(ABK)耐性MRSAの2種の耐性遺伝

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

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

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

#### 10. VREの*van*遺伝子クラスターの解析

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

#### 11. 病原細菌の産生する $\beta$ -ラクタマーゼのクラス鑑別法

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

### C. 研究結果

#### 1. 国内分離菌からのESBL遺伝子の検出

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

#### 2. メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の識別法の確立

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

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

### 3. 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性遺伝子

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

### 4. 臨床分離黄色ブドウ球菌のマクロライド耐性

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

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

### 5. 喀痰材料からのβ-ラクタマーゼの直接的検出

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

### 6. PCaseTESTの改良によるβ-ラクタマーゼのクラス分類

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

### 7. 抗OprM抗体による薬剤汲み出し型耐性菌の検出

L-agar培地上に生育した野生株のコロニーをかき取

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

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

### 8. アルベカシン耐性MRSAの耐性遺伝子の検出

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

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

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

### 10. VREの*van*遺伝子クラスターの解析

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

### 11. 病原細菌の産生するβ-ラクタマーゼのクラス鑑別法

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

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

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

#### D. 考 察

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

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

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

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

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

#### E. 特許出願等

発明の名称：メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の判別方法

発明者：荒川宜親、後藤正文

特許出願番号：特願平11-26897号

#### F. 研究発表等

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

## VIII. 特許申請書



整理番号=99506H

提出日 平成11年 2月 4日  
特願平11-026897 頁: 1/ 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 99506H

【提出日】 平成11年 2月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都立川市幸町4-52-1 幸町団地26-406

    【氏名】 荒川 宜親

【特許出願人】

    【識別番号】 591222245

    【氏名又は名称】 国立感染症研究所

【特許出願人】

    【住所又は居所】 東京都立川市幸町4-52-1 幸町団地26-406

    【氏名又は名称】 荒川 宜親

【代理人】

    【識別番号】 100092635

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

    【識別番号】 100096219

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

    【識別番号】 100095843

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 007663

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

- |           |     |   |
|-----------|-----|---|
| 【物件名】     | 明細書 | 1 |
| 【物件名】     | 図面  | 1 |
| 【物件名】     | 要約書 | 1 |
| 【プルーフの要否】 | 要   |   |

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メタローβ-ラクタマーゼ産生菌の判別方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を点在させ、さらに、この阻害剤からの距離が異なる2箇所にβ-ラクタム薬を点在させ、上記固体培地を培養し、培養後、上記2箇所のβ-ラクタム薬の周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。

【請求項2】 一方のβ-ラクタム薬は、このβ-ラクタム薬が培養期間中に拡散する範囲とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲とが重複する位置に置かれ、他方のβ-ラクタム薬は、このβ-ラクタム薬が培養期間中に拡散する範囲とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲とが重複しない位置に置かれる請求項1に記載の方法。

【請求項3】 メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスク及びβ-ラクタム薬を含有するディスクを用いて、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤及びβ-ラクタム薬をそれぞれ点在させる請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤が有機チオール化合物である請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 有機チオール化合物がメルカプト酢酸またはメルカプトプロピオン酸である請求項4に記載の方法。

【請求項6】 β-ラクタム薬が第3世代セフェム薬である請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 第3世代セフェム薬がセフトジジムである請求項6に記載の方法。

【請求項8】 β-ラクタム薬を含有する2つのディスク及びメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させるための1つのディスクを、ストリップ状の基体に1列に配置し、かつ上記メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させるためのディスクが列の一端になるようにしたことを特徴とするメタローβ-ラクタマーゼ産生菌判別用キット。

【請求項9】請求項8に記載のキットのメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させるためのディスクに、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させ、このキットを検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に置き、培養を行い、培養後、2つあるβ-ラクタム薬のディスクの周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、メタローβ-ラクタマーゼ産生菌の判別方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤と組み合わせて用いたβ-ラクタム薬により形成される阻止円により、簡便にメタローβ-ラクタマーゼ産生菌か否かを判別できる方法に関する。さらに本発明は、本発明の方法に用いるキット及びこのキットを用いたメタローβ-ラクタマーゼ産生菌の判別方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決すべき課題】

メタローβ-ラクタマーゼを産生することにより、ペニシリンからセフェム、セファマイシン、カルバペネムに至るまでの幅広い範囲のβ-ラクタム薬に耐性を獲得した緑膿菌やセラチアなどのグラム陰性桿菌が各地の医療設備から分離され問題となっている。メタローβ-ラクタマーゼをプラスミド性に産生する菌は、これまでわが国でのみ分離されてきたが、最近、英国においても分離され、海外の専門家の間でも関心が高まりつつある。

【0003】

メタローβ-ラクタマーゼ産生菌は、セファロスポリナーゼ過剰産生株などと類似の薬剤耐性パターンを示すが、後者がカルバペネムに感受性を示すのに対し、前者は、当初カルバペネム薬に感受性を示している株も、カルバペネム薬の存在下で酵素の産生が誘導され、やがてカルバペネム薬に耐性を示すようになる。従って、有効かつ適正な化学療法を実施する上で、両者を早期に識別できる検査方法の確立が必要となっていた。

## 【0004】

メタローβ-ラクタマーゼ産生菌は、第3世代セフェム、セファマイシンに高度耐性を示し、カルバペネムにも低度～高度耐性を示す。しかし、同様に第3世代セフェムに高度耐性を示すセファロスポリナーゼ過剰産生株などとメタローβ-ラクタマーゼ産生菌を病院の検査室において日常的に実施されている薬剤感受性試験や酵素学的な検査方法（βチェックなど）により識別することはこれまで不可能であった。PCR法によるメタローβ-ラクタマーゼ遺伝子を検出する方法以外に確実にメタローβ-ラクタマーゼ産生菌を判別する方法はなかった。

## 【0005】

そこで本発明の目的は、メタローβ-ラクタマーゼ産生菌を判別する方法であって、病院の検査室においても実施することが可能な程簡便な方法を提供することにある。

さらに本発明は、上記方法を利用して、より簡便にメタローβ-ラクタマーゼ産生菌を判別する方法を実施できるキット及びこのキットを用いたメタローβ-ラクタマーゼ産生菌を判別する方法を提供することにある。

## 【0006】

## 【課題を解決すべき手段】

本発明は、検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を点在させ、さらに、この阻害剤からの距離が異なる2箇所にβ-ラクタム薬を点在させ、上記固体培地を培養し、培養後、上記2箇所のβ-ラクタム薬の周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法に関する。

さらに本発明は、β-ラクタム薬を含有する2つのディスク及びメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させるための1つのディスクを、ストリップ状の基体に1列に配置し、かつ上記メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させるためのディスクが列の一端になるようにしたことを特徴とするメタローβ-ラクタマーゼ産生菌判別用キットに関する。

加えて本発明は、上記本発明のキットのメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させるためのディスクに、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有させ、この

キットを検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に置き、培養を行い、培養後、2つあるβ-ラクタム薬のディスクの周囲に形成される阻止円の違いにより、検出対象である菌がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法に関する。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の方法は、固体培地を用い、形成された阻止円により、検出対象である菌がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌か否かを判別する方法である。本発明に用いられる固体培地は、通常の薬剤耐性試験等に汎用されている固体培地でよい。固体培地は、例えば、炭素源、窒素源等の栄養分を含む寒天培地であることができる。そのような固体培地としては、例えばミュラーヒントン寒天培地（Difco社）等を挙げることができる。

#### 【0008】

上記固体培地の表面に検出対象である菌を塗布する。固体培地表面への菌の塗布方法や条件等は、薬剤耐性試験等で採用されているものをそのまま使用できる。例えば、日本化学療法学会標準法またはNCCLSで定められた寒天平板希釈法で指定されている方法を用い、ミュラーヒントン寒天培地に菌を塗布することができる。

#### 【0009】

次いで、検出対象である菌が塗布された固体培地の表面に、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤(1箇所)とβ-ラクタム薬(2箇所)とを点在させる。各薬剤の点には、具体的には、β-ラクタム薬を含有するディスクとメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスクを用いることが適当である。β-ラクタム薬を含有するディスクは、市販品があり、これを用いることができる。また、β-ラクタム薬は、治療薬として市販されているものから適宜選択することが出来、例えば、第3世代セフェム薬、セファマイン薬、カルバペネム薬等であることができる。また、第3世代セフェム薬、セファマイン薬、カルバペネム薬としては、例えば、セフトジジム、セフピロム、ラタモキシセフ、セフメノキシム、イミペネム等を挙げることができる。但し、これらの薬剤に限定される意図ではない。

$\beta$ -ラクタム薬であればいずれでも良い。尚、ディスクとして市販品がない場合でも、適当な寸法及び形状の濾紙に $\beta$ -ラクタム薬を、必要により、溶媒を用いて含浸させることで作成することができる。

#### 【0010】

メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有するディスクは、適当な寸法及び形状の濾紙にメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含浸させることで作成することができる。メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤は、メタロー $\beta$ -ラクタマーゼに対して阻害効果を有する薬剤から適宜選択することができる。メタロー $\beta$ -ラクタマーゼに対して阻害効果を有する薬剤としては、例えば、有機チオール化合物等の含硫黄化合物、亜鉛（メタロー $\beta$ -ラクタマーゼが活性部位に有する金属）に対するキレート剤（例えば、EDTA等）、や金属化合物（例えば、 $\text{HgCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 等の塩）を挙げることができる。但し、固体培地表面での拡散性や培地の成分に対して不活性であることから、有機チオール化合物であることが好ましい。有機チオール化合物としては、例えばメルカプト酢酸やメルカプトプロピオン酸等を挙げることができる。但し、これら以外の有機チオール化合物等の含硫黄化合物からも、固体培地表面での拡散性や培地の成分に対して不活性であることを考慮して、適当な化合物を適宜選択することができる。

#### 【0011】

$\beta$ -ラクタム薬及びメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の点在量は、各薬剤の固体培地表面での拡散性や培養時間（拡散時間）、さらにはメタロー $\beta$ -ラクタマーゼに対する阻害効果の強度等を考慮して適宜決定できる。例えば、 $\beta$ -ラクタム薬の場合、セフトジジムでは点在量を30~50 $\mu\text{g}$ の範囲とすることが適当であり、またメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の場合、メルカプト酢酸やメルカプトプロピオン酸では、原液を2~5 $\mu\text{g}$ の範囲とすることが適当である。但し、これらはいくまでも目安であり、検査対象とする菌の種類に応じて、 $\beta$ -ラクタム薬の周囲に形成される阻止円の形状や大きさ等を考慮して適宜変化させることができる。

#### 【0012】

$\beta$ -ラクタム薬の2箇所での点在位置は、メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤から

の距離が異なるようにする。より具体的には、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤に近い方のβ-ラクタム薬は、このβ-ラクタム薬が培養期間中に拡散する範囲とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲とが重複する位置に置かれ、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤から遠い方のβ-ラクタム薬は、このβ-ラクタム薬が培養期間中に拡散する範囲とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲とが重複しない位置に置かれる。好ましくは、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤に近い方のβ-ラクタム薬を、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲内に置く。

#### 【0013】

β-ラクタム薬及びメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲は、各薬剤の種類と点在量、及び培養条件(主に時間)により変化するので、使用する薬剤の種類と点在量及び培養条件から予め求めておくことができる。例えば、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤に近い方のβ-ラクタム薬とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤との距離は、例えば、0.5～2cm程度とし、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤から遠い方のβ-ラクタム薬とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤との距離は、固体培地を収納する容器(例えば、シャーレー)の大きさにもよるが、開口径が9cmのシャーレーの場合例えば、3～6cm程度とすることができる。

#### 【0014】

メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤及びβ-ラクタム薬を表面に置いた固体培地は、培養される。培養条件は、例えば、35～37℃、12～36時間の範囲とすることができる。但し、培養条件、特に時間は、上記薬剤の拡散範囲との兼ね合いを考慮して適宜決定する。

#### 【0015】

上記培養により、固体培地表面に置かれたβ-ラクタム薬及びメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤は、固体培地表面及び内部を拡散する。対象とする菌がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌である場合、この菌は、メタローβ-ラクタマーゼを産生することによりβ-ラクタム薬に耐性を示す。従って、固体培地表面にβ-ラクタム薬だけを置いたのでは、阻止円は観察されないか、観察されても、ディスクに近接した小さな阻止円が形成されるだけである。即ち、β-ラクタム薬と

メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤との拡散範囲が重複しない位置にあるβ-ラクタム薬の周囲には、検査対象がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌である場合には、阻止円は観察されないか、観察されても、ディスクに近接した小さな阻止円が形成されるだけである。これは、メタローβ-ラクタマーゼ産生菌が産生するメタローβ-ラクタマーゼの作用により、β-ラクタム薬だけでは菌の生育がほとんどまたは全く妨げられないためである。ところが、β-ラクタム薬とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤との拡散範囲が重複する位置にあるβ-ラクタム薬の周囲には、対象とする菌がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌であっても大きな阻止帯が観察される。これは、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤により、メタローβ-ラクタマーゼの活性が阻害され、その結果、β-ラクタム薬が菌の生育を妨げることができるようになったためである。ここで観察される阻止帯の形状は、β-ラクタム薬の拡散範囲とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲との重複の程度により変化する。重複範囲が広い場合には、円形になる場合（後述の図1中の（3））があるが、そうでない場合には、歪んだ形（後述の図1の（1）及び（2））になる。しかし、いずれの場合にも、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲と重複しない位置にあるβ-ラクタム薬の周囲に形成される（形成されない場合もあるが）阻止円とは大きさの違いから明確に区別できる。

#### 【0016】

一方、検査対象がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌でない場合には、2つの場合がある。β-ラクタム薬が菌の生育を妨げ、大きめの阻止円を形成する菌（例えば、ペニシリナーゼ産生菌等の菌）である場合とメタローβ-ラクタマーゼ産生菌ではないが、β-ラクタム薬によっては菌の生育が妨げられず阻止円が形成されない場合（例えば、クラスCβ-ラクタマーゼ産生菌、ESBL産生菌等の菌の場合）である。前者は、メタローβ-ラクタマーゼ産生菌でないので、β-ラクタム薬のみの薬剤耐性試験で判別できる。即ち、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を併用しないβ-ラクタム薬の周囲に大きな阻止円が形成され、判別できる。しかし、後者は、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤を併用せずにβ-ラクタム薬のみを使用した薬剤耐性試験ではメタローβ-ラクタマーゼ産生菌であるのか否かは判別できない。それに対して本発明の方法では、この判別が可能となる。

## 【0017】

この点を図1に示す図面に代わる写真を用いてさらに説明する。

図中の左側の3つは、検査対象となる菌がメタローβ-ラクタマーゼ産生菌（上から、（1）IMP-1(プラスミド性メタローβ-ラクタマーゼ)産生セラチア・マルセセンス(*S. marcescens*)、（2）IMP-1産生クレブシエラ・ニューモニアエ(*K. pneumoniae*)（肺炎桿菌）、（3）IMP-1産生緑膿菌）である。一方、右側の3つは、検査対象となる菌が上から（4）AmpC過剰産生セラチア・マルセセンス(*S. marcescens*)、（5）SHV-5a産生クレブシエラ・ニューモニアエ(*K. pneumoniae*)、（6）AmpC過剰産生緑膿菌である。また、固体培地を敷きつめたシャーレー上の上方左側にあるディスクはメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤含有ディスクである。シャーレー上の下方と上方右側にあるディスクは、β-ラクタム薬含有ディスクであり、下方のディスクは、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲外にあり、かつβ-ラクタム薬の拡散範囲とも重複しない。上方右側にあるβ-ラクタム薬含有ディスクは、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲内にある。

## 【0018】

メタローβ-ラクタマーゼ産生菌である（1）～（3）では、シャーレー上の下方のβ-ラクタム薬含有ディスク周辺に阻止円は形成されていない。それに対して上方のメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤含有ディスクと隣接して置かれたβ-ラクタム薬含有ディスクには阻止帯が観察され、メタローβ-ラクタマーゼ阻害剤含有ディスクに阻止円が現れている。このように、β-ラクタム薬の拡散範囲とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲とが重複する位置に置かれたβ-ラクタム薬(上方のディスク)の周囲に阻止帯が観察され、β-ラクタム薬の拡散範囲とメタローβ-ラクタマーゼ阻害剤の拡散範囲とが重複しない位置に置かれたβ-ラクタム薬(下方のディスク)の周囲に阻止円が観察されない場合、検査対象の菌はメタローβ-ラクタマーゼ産生菌である。

## 【0019】

それに対して、メタローβ-ラクタマーゼ産生菌でないが、β-ラクタム薬が効かないAmpC過剰産生セラチア・マルセセンス(*S. marcescens*)を塗布した（4）

の場合、シャーレー上のいずれの $\beta$ -ラクタム薬含有ディスク周辺にも阻止円は形成されていない。メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌でないが、 $\beta$ -ラクタム薬が効かないSHV-5a産生クレブシエラ・ニューモニアエ(*K. pneumoniae*)及びAmpC過剰産生緑膿菌を塗布した(5)及び(6)の場合、いずれの $\beta$ -ラクタム薬含有ディスクにも小さな同様の形状の阻止円が観察される。このように、検査対象がメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌である場合と検査対象がメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌でない場合とで、得られる阻止円のパターンが異なり、両者を判別することが可能になる。

#### 【0020】

本発明のメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌判別用キットは、 $\beta$ -ラクタム薬を含有する2つのディスク及びメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させるための1つのディスクを、ストリップ状の基体に1列に配置し、かつ上記メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させるためのディスクが列の一端になるようにしたことを特徴とする。本発明のキットは、上記本発明の方法を簡便に実践することを目的として考案されたものである。本発明のキットに使用する $\beta$ -ラクタム薬を含有する2つのディスクは上記本発明の方法で説明したものと同様のディスクを使用できる。また、メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させるための1つのディスクは、濾紙等のメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させることができるものであれば良い。これらのディスクをストリップ状の基体に一列に、かつ上記メタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含有させるためのディスクが列の一端になるよう配置する。これにより、 $\beta$ -ラクタム薬を含有する2つのディスクの一方は、このディスクに含有される $\beta$ -ラクタム薬が培養期間中に拡散する範囲とメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲とが重複する位置とし、他方のディスクは、このディスクに含有される $\beta$ -ラクタム薬が培養期間中に拡散する範囲とメタロー $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤が拡散する範囲とが重複しない位置とすることができる。

#### 【0021】

本発明のキットの一例を図2に示す。図2の上図は、ディスクを配列した側の基体であり、下図はディスクを配列した基体の側面である。ストリップ状の基体