分担研究課題：呼吸器感染症ならびに化膿性髄膜炎例から分離される肺炎球菌とインフルエンザ菌における耐性メカニズム解析とその迅速診断法に関する研究

分担研究　　生方　公子（財）微生物化学研究所

〔研究要旨〕変貌する耐性肺炎球菌と耐性インフルエンザ菌を遺伝子解析によって識別するprimerの再構築を行ない，さらに識別の精度をあげることができた。肺炎球菌の精度は99.6%，インフルエンザ菌のそれは95%で，結果判明までの所要時間は2.～2.5時間であった。化膿性髄膜炎・全国サーベイランス研究において，1年間に肺炎球菌例200例とインフルエンザ菌例203例からの分離菌に対してPCRが試みられた。PCRの結果を当日返却することにより，臨床ではその結果を元に適切な抗菌薬へと変更することが可能であることが示唆された。当該PCR法を応用すれば，重症感染症においては極めて有用であろうと判断された。また，cost effectiveの観点からもここで報告した当該細菌に対するPCR法は有用であると考えられた。

研究協力者　明治製菓㈱薬品総合研究所
千葉菜穂子，小林　玲子，長谷川恵子
砂川慶介　北里大学医学部感染症学講座

A. 研究目的

本邦においては，市中に発生する細菌性呼吸器感染症や化膿性髄膜炎例から分離される頻度の高い肺炎球菌やインフルエンザ菌において，耐性化が急速に進行している。その背景には抗菌薬の不適切な使用が選択的圧力になっていると思われる。さらに血清型bのインフルエンザ菌に対するワクチン接種の未実施，社会的環境要因の変化等が指摘されている。

抗菌薬の適切な使用を進めるには，検出菌の感受性を短時間で正確に判断できる手法が必要である。私どもは高い精度で検出菌の感性/耐性を識別できる「PCR迅速診断キット」を構築してきたが，耐性化の進行と共に，遺伝子変異と感受性結果とが不一致の株が散見されつつあった。PCRの精度を一定に保つためには当該菌株の遺伝子解析を行い，primerを再構築して使用に耐えうるものに改良していく必要があり，今年度はそのことを重点目標に検討し，実際に化膿性髄膜炎例や呼吸器感染症から検出された菌に対して精度の検証を試みた。

B. 研究方法

1) 対象菌株：平成12年11月以降，平成13年10月までの1年間に全国の細菌検査室から送付を受けた菌株を対象とした(呼吸器由来：肺炎球菌248株，インフルエンザ菌178株，化膿性髄膜炎由来：肺炎球菌200株，インフルエンザ菌203株)。

2) primerの設計：肺炎球菌のβ-ラクタム系薬耐性を識別するprimerの再構築は，感受性とPCRの結果とが不一致の株について *pbp1a*，*pbp2x*，*pbp2b* 遺伝子解析を実施した。その結果，*pbp1a* に使用していたprimerが新たに出現した保存性アミノ酸配列のSTMK中のThr→Ser置換を検出できていなかったと判断された。このため，従来のsense側primerをそれらの耐性菌に対応できるよう再設計した。

インフルエンザ菌のβ-ラクタム系薬耐性については，本邦で特異的に増加しているPBP3変異によるBLNARを軽度耐性(Low-BLNAR)と明らかな耐性(BLNAR)に識別できるprimerを再設計した。

3) 倫理面への配慮：化膿性髄膜炎サーベイランスにおいては，症例の倫理面に配慮し，各施設

からの菌株についてはイニシャルのみの記載を依頼した。また，得られた成績については，担当の検査技師を通じて担当医へ報告された。個々の結果については公表しないことにした。

C. 研究結果

1) 肺炎球菌の耐性遺伝子検索のための primer

表1には遺伝子解析の結果から再構築した肺炎球菌の耐性遺伝子検索のためのprimer一覧を示す。従来のprimerと大きく異なる点は，*pbp1a*のprimerである。保存性アミノ酸配列のSTMKのThr→Alaへの置換が耐性に影響していたことから，この置換を検索できるように変更した。図1は新たなprimerによって増幅されるDNA断片の位置関係を示す。従来のKitに較べて，*pbp1a*の位置がやや下方にある。

一方，図2には，あらたなprimerによって検索した肺炎球菌全体における解析結果であるが，従来の98.3%の精度から99.6%の精度となった。遺伝子変異のないPSSPは0.031 μg/ml，*pbp2x*変異株は0.063 μg/ml，*pbp1a+pbp2x*変異株は0.125 μg/ml，*pbp2x+pbp2b*変異株は0.25 μg/ml，そして*pbp1a+pbp2x+pbp2b*変異株は2 μg/mlにピークを有していた。それぞれの分布をみると，ピークを中心に試験管で前後±1本に集中していることが明らかにされた。

このようなことから，この迅速診断方法を重症感染症の化膿性髄膜炎例に適応することを試みた。

2) 化膿性髄膜炎例由来肺炎球菌の耐性遺伝子

1年間に「化膿性髄膜炎全国サーベイランス」によって収集された肺炎球菌は200株を超えた。そのうちの200例からの解析成績を図3に示す。図は症例の年齢と分離菌の感性・耐性との関係を示してある。

菌株が送付されてくると，直ちにPCRを実行し，その間に血清型別を実施した。結果が得られるまでの所要時間は2時間で，結果はFAXによって担当の検査技師へ報告することをルーチンとした。

肺炎球菌性髄膜炎の発症年齢は，図にみられるように2峰性を呈することが特徴で，この点がインフルエンザ菌性髄膜炎と異なっていた。発症は生後3ヶ月位から認められ，6ヶ月を過ぎると急速に症例数が増え，1歳台をピークとして学童期まで暫時減少した。しかし，それ以降の年齢層でも発症例があり，50歳から60歳台にもう一つのピークが認められた。20歳未満とそれ以上の比率は7対3であった。成人例においては痙攣，意識不明などを主訴として突然発症し，短時間で重篤化し，神経内科，救命救急センター，脳外科などへ搬送されていた。約半数例に糖尿病やその他の基礎疾患が認められ，DICの併発や神経麻痺あるいは死亡例など予後不良例が多かった。

一方，pbp遺伝子変異からみた耐性型の特徴は，小児由来株ほどPRSPとPISPが多く，PSSPはごくわずかであった。それに対し，成人例ではPRSPによる症例もあるが，むしろPISPやPSSPによる発症例が多かった。

ここには示していないが，小児に髄膜炎を惹起するタイプは血清型6Bや6Aが多く，次いで19Fと23Fであった。肺炎例からの分離頻度が高い14型もみられた。日本で分離されるこれらのタイプにはPRSPが圧倒的に多いので，必然的に小児ではPRSPによる発症例の多いことへとつながっていると思われた。また，6型関連の頻度が高いのは，母体からの抗体移行がないためとも考えられた。

一方，成人例ではムコイド型の3型や9，22型など病原性の高いタイプと，23型のように病原性としては低いタイプがみられた。成人の劇症例では，起炎菌に対する抗体が獲得されないままに過ぎてきた可能性も考えられ，宿主側も問題を有しているようにみえるが詳細は不明であった。

PRSP に対する治療抗菌薬であるが，抗菌力と殺菌力が優れているのはカルバペネム系薬であった。中でも日本でのみ使用されているパニペネムがほぼすべての PRSP の発育を 0.125 μg/ml でカバーしていた。欧米ではバンコマイシンやメロペネムが使用されているが，これらの抗菌力は 0.5 μg/ml 前後と必ずしも良好でなく，また本邦においては未認可である。セフォタキシムとセフトリアキソンも使用されてきたが，PRSP に対する MIC は 1～2 μg/ml と劣り，アンピシリンや日本で開発されたいわゆる第三世代セフェム系薬はさらに劣っていた。PRSP に対する注射薬の MIC_{90} は，パニペネム(0.125 μg/ml) ≫ MEPM = VCM (0.5) ≫ CTX = CTRX(2) > CTM = PIPC = ABPC (8)であった。

髄膜炎治療に際しては，髄液中の薬剤濃度が起炎菌に対する MBC(最小殺菌濃度)の 10 倍以上必要とされているが，起炎菌が PRSP の場合にはパニペネムでも 2～3 μg/ml の髄液中濃度が必要という計算になり，他の薬剤では濃度が満たされていない場合も推定された。

このような状況において，PCR によって起炎菌の耐性遺伝子を特定し，その耐性レベルを正確に推定することは，臨床医がタイミングをのがさずに適切な抗菌薬へ変更できることへと繋がり，①不必要な併用，②副作用の軽減，あるいは入院期間の短縮による医療費の削減にも役立つと考えられた。

3)インフルエンザ菌の primer

インフルエンザ菌が ABPC に耐性化するにはいくつかのメカニズムが知られているが，その耐性機構に基づく定義を先に示す。①耐性遺伝子を持たない ABPC 感性菌は BLNAS，②β-lactamase 産生 ABPC 耐性菌は BLPAR (TEM-1 type と ROB-1 type)，③PBP3 変異による ABPC 耐性菌は BLNAR (Low-BLNAR と BLNAR)，④β-lactamase 産生 +PBP3 変異株は BLPACR である。

BLNAR では図 4 に示すように隔壁合成酵素の PBP3 遺伝子(*ftsI*)上に変異が生じており，そのうちの 3 ケ所の変異が耐性化に関与しているが，1 ケ所のみ変異した株は耐性レベルが低いので Low-BLNAR， 2 ケ所に変異を有する株はセフェム系薬の感受性が著しく低下(16-64 倍)しているので，BLNAR として区別される。

再構築した primer は**表 2** に示すが，変異が少ないために設計が難しく，Low-BLNAR は感性側の遺伝子を増幅して，DNA 断片が検出されない場合を当該耐性菌とした。BLNAR は DNA 断片が検出された場合を当該耐性菌とした。その他に TEM-1 型と ROB-1 型β-lactamase 産生性も遺伝子で検索した。

図 5 にはこの primer kit によって実際に実行した臨床分離のインフルエンザ菌の成績を示す。一般的には写真にみられるように DNA 断片はクリアーで非特異的なバンドは見られないが，primer の sequence 中に変異があると非特異的なバンドが見られることが時に認められた。そのため，Low-BLNAR の検出精度は 95% 台であった。コロニーのピックアップから遺伝子解析終了までの所要時間は 2.5 時間であった。

特に，化膿性髄膜炎例において菌量が少なく感受性結果が判明するまでに 2 日以上を要する場合には，1 コロニーで十分な感度は臨床的有用性が高いであろうと考えられた。

4)インフルエンザ菌の薬剤感受性と遺伝子変異の関係

図 6 と図 7 には，得られた成績の中から標準薬である ABPC と cefotaxime(CTX)のインフルエンザ菌 247 株に対する感受性と遺伝子変異の関係を示す。両図からも明らかなように，β-lactamase 産生菌は極めて少なく，それに対し BLNAR が 14.9%へと急速に増加してきていることが注目された。Low-BLNAR は 29.2% であった。CTX に代表されるセフェム系薬では BLNAR と Low-BLNAR の感受性は比較的

正確に識別されていたが,ABPCでは両者を明確に識別できていないことが示された。

細菌検査室においては通常実施されている生物学的手法では,これらの耐性菌を区別することは難しいであろうと思われた。

そのようなことから,遺伝子解析と薬剤感受性を測定したインフルエンザ菌200株以上について，いくつかの感受性discの阻止円形成との関連性を調べ,ブレイクポイントをどこに再設定すればよいかを検討した。結果として，ABPC，CCL，CFDN，CPDXの4つのdiscを使用して判定するのが現在最も精度の高い識別方法であると考えられた。

3)化膿性髄膜炎例由来インフルエンザ菌の耐性遺伝子

1年間に解析されたインフルエンザ菌203株の薬剤耐性型と発症年齢との関係を図8に示す。これらはすべてHibワクチンの対象となるserotype bであったことが注目された。また，起炎菌の耐性化が急速に進行していることも明らかにされた。BLNASは34.5%と激減し，TEM-1産生のBLPARが減少してはいるものの，依然21.2%認められた。次いで，Low-BLNARが30.0%，BLNARが7.9%も認められた。1999年までの株にはBLNARを認めておらず，2000年以降急速に増加してきていることが明らかにされた。また，BLPACRも6.4%の割合で分離され始めており，よりPBP変異を主体とした耐性菌へと移行しつつあることが鮮明になってきた。

発症年齢は1歳未満が34.0%，1歳台が25.6%，2歳以降4歳まで暫時減少し，5歳以上ではめったにみられない。1994年の上原らの成績と比較すると，社会環境の変化に伴い発症が次第に低年齢化している印象を受けた。症例自身が保育園児の場合，あるいは兄弟が保育園あるいは幼稚園へ通園している場合の発症率が高かった。

この背景には，我が国で好まれる経口抗菌薬のインフルエンザ菌に対する抗菌力の弱いことがあげられる。加えて，欧米先進国では10年前より施行されているHibワクチンが本邦においては実施されていないということもある。

一方，抗菌薬が投与されていた症例では，セフジニル，セフポドキシム， セファクロル等の投与例が多かった。小児科領域で処方されている経口抗菌薬はほとんどがセフェム系薬であるが，それらの常用投与量における薬物動態学的/薬剤力学的(PK/PD)パラメーターからは，セフジトレンを除いた薬剤のほとんどがBLNARには無効(<20%)と算出される。

このことは，投与薬が臨床的・細菌学的に無効であるばかりでなく，ヒトを介して耐性菌の急速な伝播を助長していると思われた。

5. BLNARに対する注射薬感受性

入院直後の治療薬は従来推奨されてきたCTX+ABPCの併用が最も多かった。耐性菌と判明した後に抗菌薬は変更されているが，治療終了までの平均投与日数は,BLNARで25日，Low-BLNAR，TEM-1 type，およびBLNASでは15日前後となっており，BLNAR例で治療終了までの期間が長引いていた。“後遺症あり”と記載されていた症例は全体の17.6%であった。

急激な耐性化と後遺症例の頻度をみると，インフルエンザ菌性髄膜炎の初期治療薬は根本的に見直す必要があるといわざるを得ない。起炎菌としてTEM-1産生株，Low-BLNAR，BLNARが多いことを考えると，ペニシリン系薬の併用はほとんど意味がなくなっている。BLNARに対するMIC_{90}が比較的優れているのは，セフトリアキソン(0.25μg/ml)＞メロペネム＝セフォタキシム(0.5)＞パニペネム(1)で,セフォチアムやセフゾプランのそれは4μg/ml以上と高い。

しかし，見かけの抗菌力に優れるセフェム系薬の単独使用でBLNARに有効であるという

確たる証拠はない。インフルエンザ菌は元々薬剤を作用させても容易に溶菌せず，薬剤消失と共に再増殖してくる菌である。血中濃度半減時間が短く，PAE 効果のみられないセフェム薬は，作用機序の異なるメロペネムとの併用が理論上は有効と思われるが，メロペネムは米国では髄膜炎への適応が認められているものの，本邦では未認可であるという問題を抱えている。基礎的検討の上で，臨床例の慎重な積み重ねが必要であろう。

D. 考察と E.結論

耐性肺炎球菌と耐性インフルエンザ菌を迅速に診断できる PCR 法はこの 2 年間で「迅速診断 kit」として確立できたと考えている。要は，検査室において，Kit 製品に対して保険点数がつくか否かで使用が定着するどうかということである。

本来はこれらの検証を検査室レベルで行ない，保険点数が獲得できるように努力すべきであろうが，急速に変貌する肺炎球菌やインフルエンザ菌性髄膜炎のことを考えると，重症感染症例に限って PCR が認められると臨床的にも極めて有用であると考えている。

繰り返しになるが，特にインフルエンザ菌の髄膜炎例増加は，セフェム系薬を好む我が国特有の現象である。一昨年の人口統計では 4 歳以下の小児数は 594 万人となっている。この数で私どもが収集し得た症例数で **10 万人あたりの発症率を計算すると 2.3 人**となる。我が国全体の年間発症数は恐らくこの 4-5 倍である。米国 CDC の統計では，本症発症数は 1997 年には 1.3 人/10 万人，そのうち type b による発症は 0.4 人と報告されている。米国では Hib 感染症はワクチン導入以前の過去の話となっている。保育園児の増加といった社会環境の変化を考えると，BLNAR による髄膜炎は既に大きな社会問題である。小児の確実な抗体獲得のためにも，Hib ワクチンの早急な導入が切に望まれる。

F. 研究発表

論文

1. K.Ubukata, Y. Shibasaki, K. Yamamoto, N. Chiba, K. Hasegawa, Y. Takeuchi, K. Sunakawa, M. Inoue, and M. Konno: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β-lactam resistance in β-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrobial. Agents Chemother. 45:1693-1699, 2001
2. K. Ubukata, N. Chiba, K. Hasegawa, Y. Shibasaki, K. Sunakawa, M. Nonoyama, S. Iwata, and M. Konno. Differentiation of β-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* from other *H. influenze* strains by a disc method. J. Infect. Chemother. 8:65-74, 2002
3. K. Hasegawa, K. Yamamoto, N. Chiba, S. Iwata, K. Nagai, M.R. Jacobs, PC Appelbaum, K. Sunakawa, and K. Ubukata.: Molecular comparison of ampicillin resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Antimicrobial Agents Chemother. 投稿中

速報

1. 生方公子，砂川慶介：化膿性髄膜炎・全国サーベイランス速報 2，平成 13 年 4 月 30 日発行
2. 生方公子，砂川慶介：化膿性髄膜炎・全国サーベイランス速報 3，平成 13 年 11 月 20 日発行

学会発表

1. K. Hasegawa,, K. Yamamoto, K. Nagai, M.R. Jacobs, PC Appelbaum, K. Sunakawa, and K. Ubukata.: Molecular characterization of ampicillin resistant genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. 41st ICAAC, Poster

#292

2. K.Ubukata, N. Chiba, K. Hasegawa, Y. Shibasaki, M. Konno: Surveillance of invasive *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in Japan from 1998-2000. 41st ICAAC, Poster #682
3. Y. Shibasaki, N. Chiba, K. Hasegwa, M. Nonoyama, K. Sunakawa, S. Iwata, and K. Ubukata: Prevalence of β-lactam antibiotic resistant isolates among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* strains from patients with meningitis. 41st ICAAC, Poster #1528
4. K. Ubukata: *H. influenzae* and respiratory *Streptococci*. – Surveillance based on the resistant Mechanisms for β-lactam and macrolide antibiotics - Joint Scientific Meeting of the British and Japanese Societies for Antimicrobial Chemotherapy.

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers for *Streptococcus pneumoniae* PCR kit.

Name (gene)	Sequence (5' to 3')	Position*	Product length (bp)
Autolysin (*lytA*)			
ALY3	CAACCGTACAGAATGAAGCGG	681-701	
ALY4	TTATTCGTGCAATACTCGTGCG	999-978	319
PBP 1A (*pbp1a*)			
PBP1A-2037S	AAACCGCGACTGGGGATCAAC	2037-2058	
PBP1A-2275R	GGTTGAGTCCGACCTTGTTT	2299-2275	263
PBP 2X (*pbp2x*)			
PBP2X-1255S	CCAGGTTCCACTATGAAAGTG	1255-1275	
PBP2X-1431R	ATCCCAACGTTACTTGAGTGT	1451-1431	197
PBP 2B (*pbp2b*)			
PBP2B-1566S	CCTATATGGTCCAAACAGCCT	1566-1586	
PBP2B-1693R	GGTCAATTCCTGTCGCAGTA	1712-1693	147
Macrolide efflux (*mefA*)			
MEF-180S	GGGACCTGCCATTGGTGTGC	180-199	
MEF-562R	CCCAGCTTAGGTATACGTAC	581-562	402
Adenine methylase (*ermB*)			
ERM-721S	CGTACCTTGGATATTCACCG	721-740	
ERM-922R	GTAAACAGTTGACGATATTCTCG	944-922	224

Figure 1. ゲル電気泳動による肺炎球菌薬剤耐性遺伝子の解析

写真にはPSSPの*pbp*DNAとマクロライド耐性遺伝子のDNA増幅位置を示す。

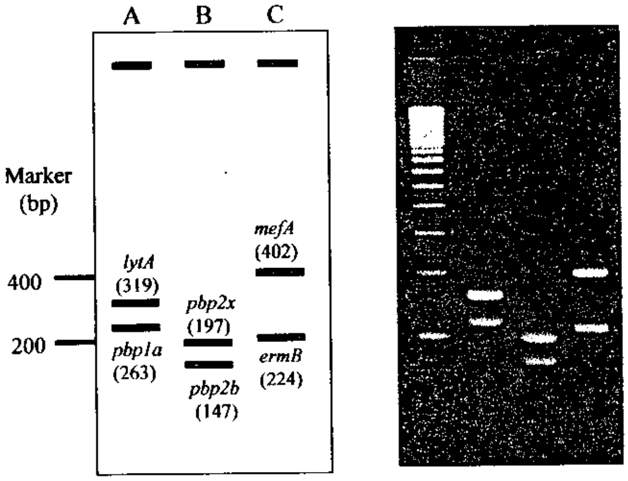


Figure 2. 肺炎球菌のペニシリンG感受性と再構築したprimerを用いたPBPs遺伝子変異解析との関係 *(n=248)*

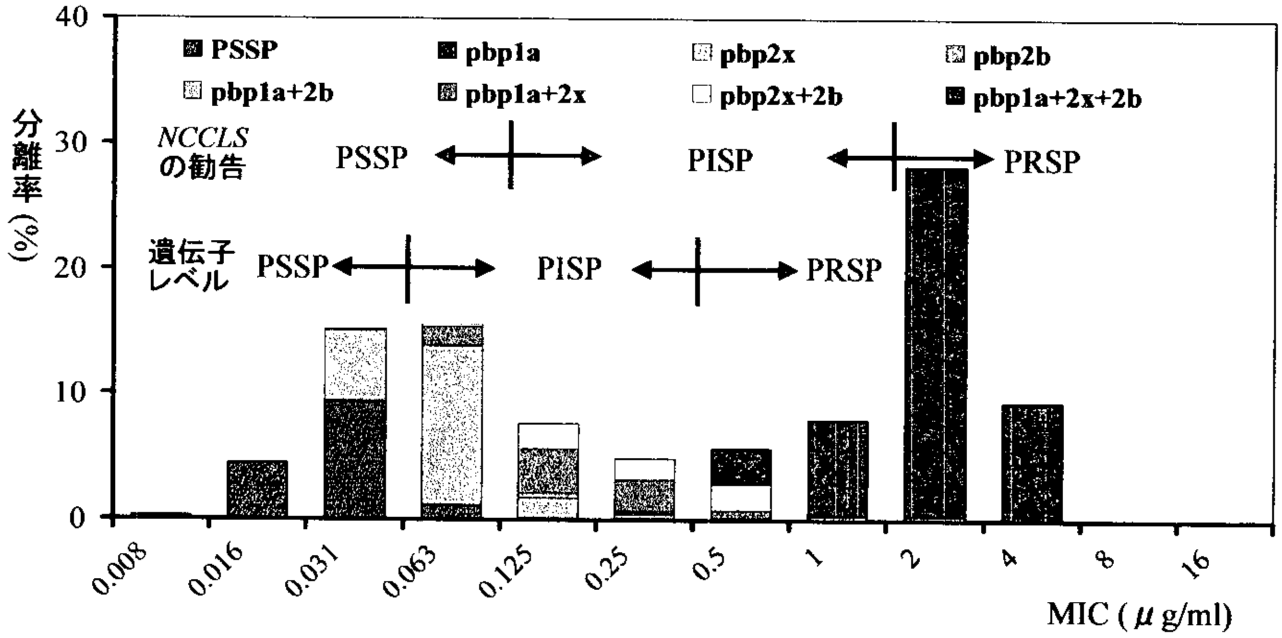


Figure 3. 肺炎球菌性髄膜炎の患者年齢と遺伝子学的にみた耐性菌の割合 *(n=200)*

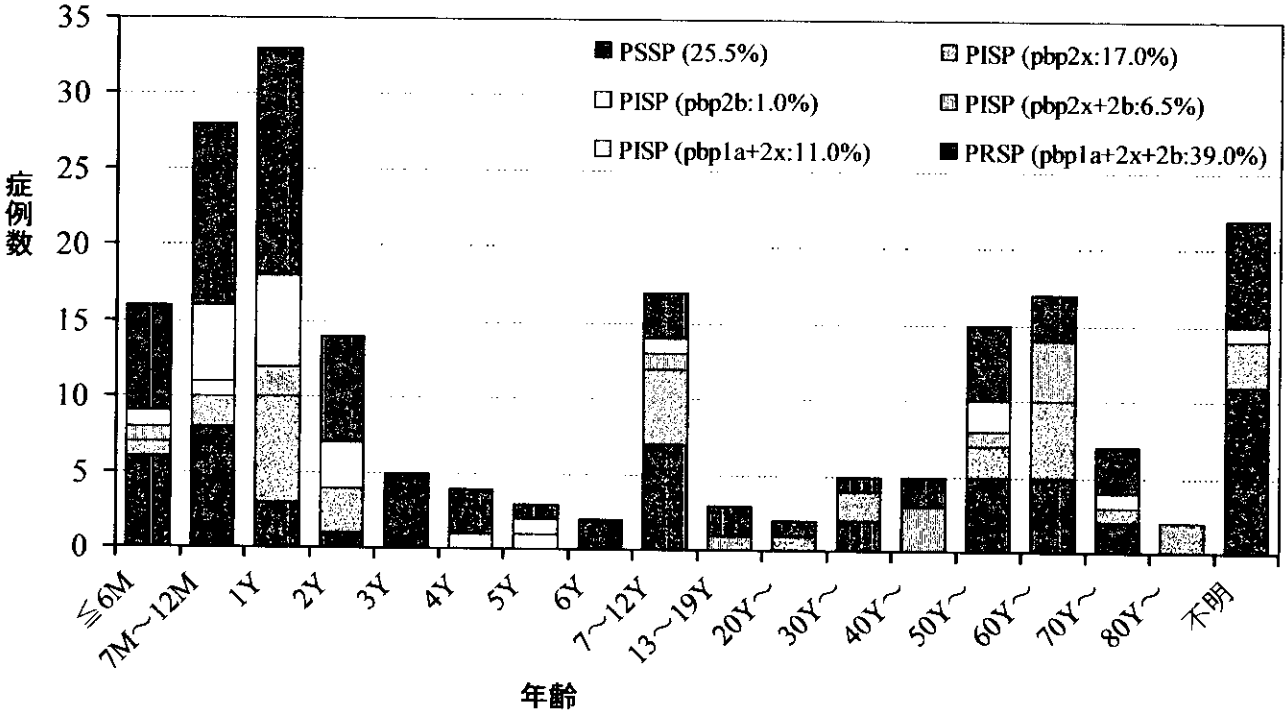
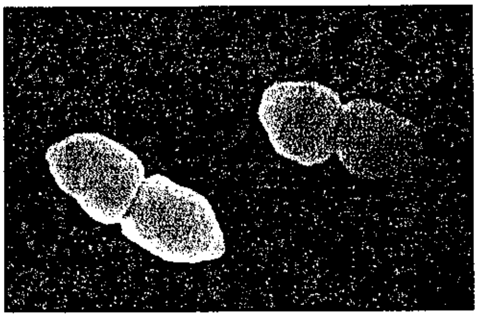
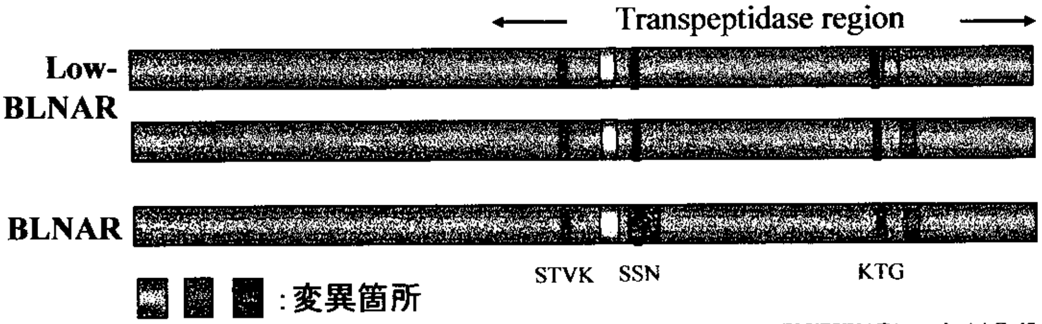


Figure 4. アンピシリン耐性肺炎球菌(BLNAR)の耐性メカニズム



インフルエンザ菌のPBP3遺伝子(*ftsI*)は菌分裂時の隔壁合成に関わる酵素をコードしている．耐性に関わる主な変異箇所は現在3箇所見出されている．軽度耐性菌では，図中にKTGと記載されたアミノ酸配列近くに変異がみられ，明らかなBLNARではさらにSSNの近くにも変異が認められる．



(K.UBUKATA, et.al., AAC, 45:1695-99,2001)

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers for ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*

Primer name (gene)	Sequence (5' to 3')	Primer length (mer)	Position	cDNA length (bp)
P6 *(p6)*[a]				198
P6-S	ACGATGCTGCAGGCAATGGT	20	141-160	
P6-R	CATCAGTATTACCTTCTACTAAT	23	316-338	
Serotype-b[b]				224
TypeB-S	AGATACCTTTGGTCGTCTGC	20	5483-5502	
TypeB-R	CTTACGCTTCTATCTCGGTG	20	5725-5706	
TEM-1 *(bla)*[c]				458
TEM-S	TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC	23	350-372	
TEM-R	TCCATAGTTGCCTGACTCCCC	21	807-787	
ROB-1 *(bla)*[d]				231
ROB-S	AAGCCCGCATTGGCGTTTAT	20	475-494	
ROB-R	GGGCAATCGTCATGCCTTTG	20	705-686	
PBP3-S *(ftsI)*[e]				551
PBP3S-S	GATACTACGTCCTTTAAATTAAG	23	2968-2990	
PBP3S-R	GCAGTAAATGCCACATACTTA	21	3498-3518	
PBP3-BL *(ftsI)*[f]				465
PBP3BL-S	TTCAAGTAACCGTGGTGTGAC	21	1134-1154	
PBP3BL-R	GCAGTAAATGCCACATATTTC	21	1598-1578	

[a] P6 membrane protein gene (Accession No. M19391): Nelson, M. B., et al., Infect. Immun., 1988, 56: 128-134.
[b] Capsular polysaccharide serotype-b gene (Accession No. X78559): Van Eldere, J., et al., Mol. Microbiol., 1995, 15:107-118.
[c] TEM-1 type *bla* gene (Accession No. J01749): Sutcliffe, J. G., Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1978, 75(8): 3737-3741.
[d] ROB-1 type *bla* gene (Accession No. AF022114): Juteau, J.M., et al., Antimicrob Agents Chemother., 1990, 34: 1354-1359.
[e] PBP3-S (*ftsI*) gene (Accession No. U32793): Fleischmann, R. D., et al., Science 1995, 69 (5223): 496-512.
[f] PBP-BL (*ftsI*) gene (Accession No. AB035740): Ubukata, K., et al., Antimicrob. Agents Chemother., 2001, 45:1693-1699.

Figure 5. インフルエンザ菌における各種遺伝子のPCRによる解析

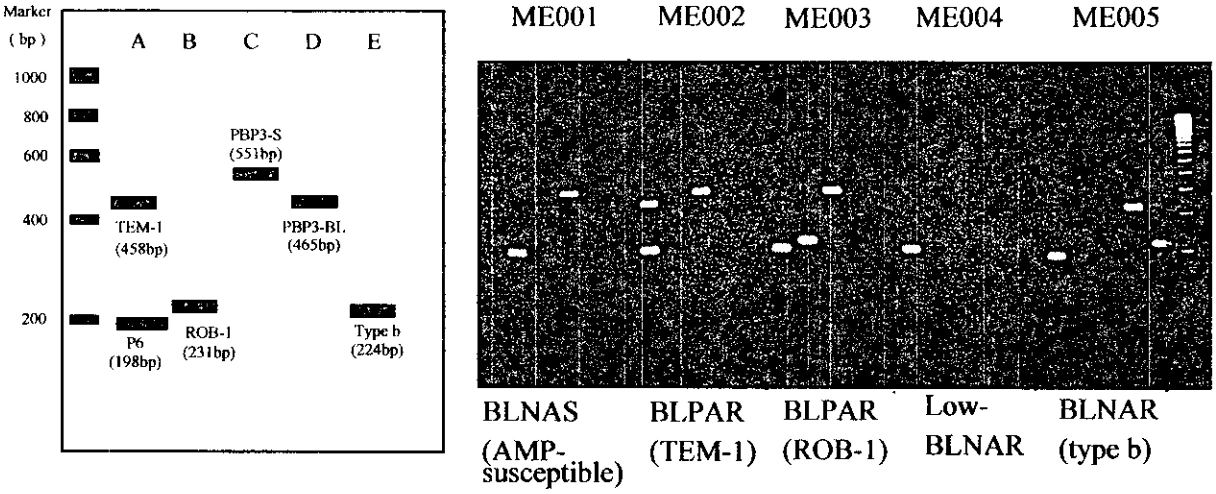


Figure 6. インフルエンザ菌に対するアンピシリンの感受性と遺伝子変異との関係

(n=178株)

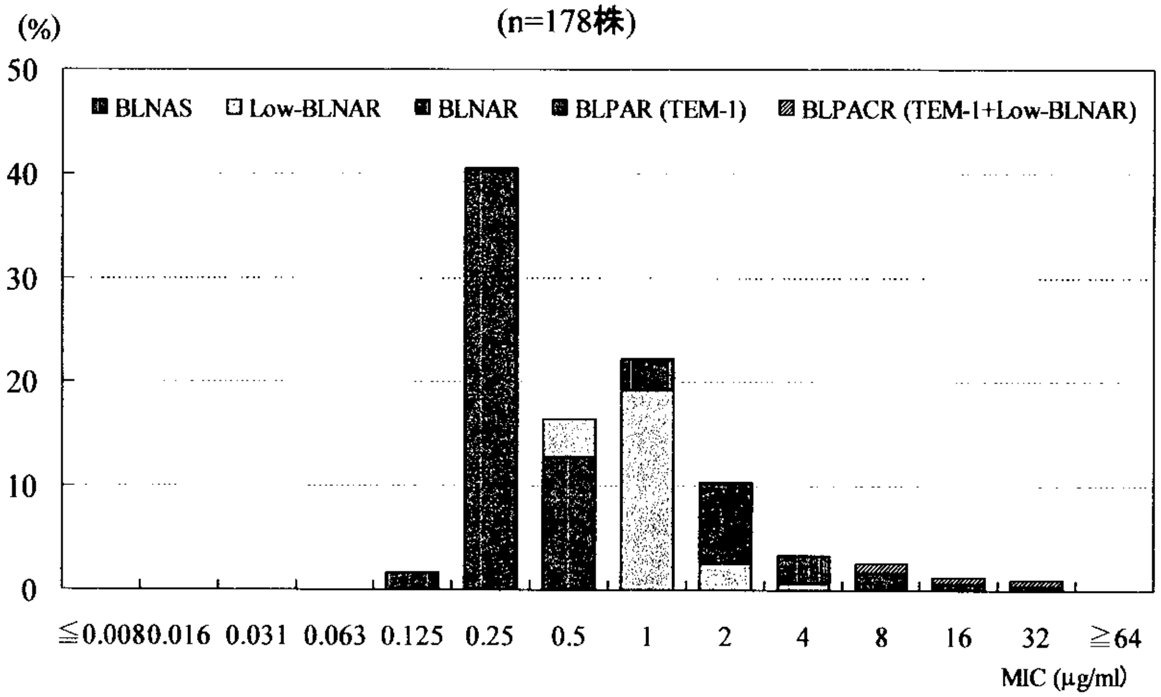


Figure 7. インフルエンザ菌に対するアンピシリンの感受性と遺伝子変異との関係

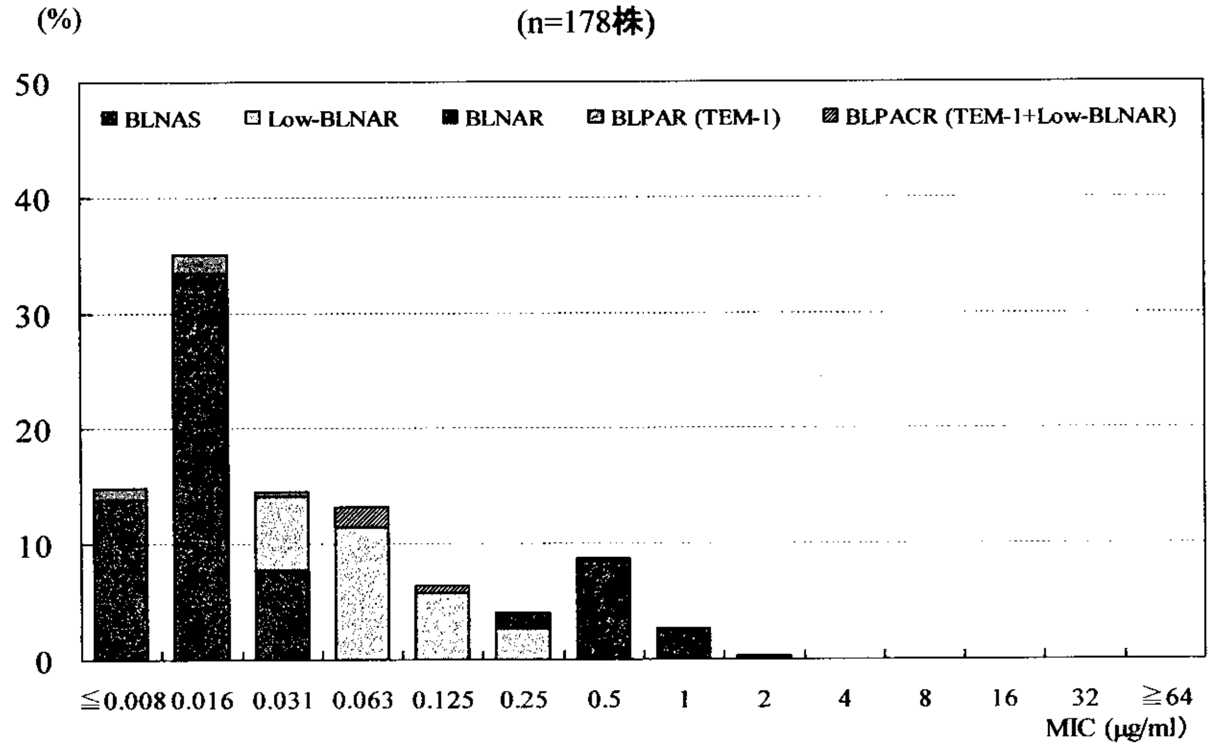
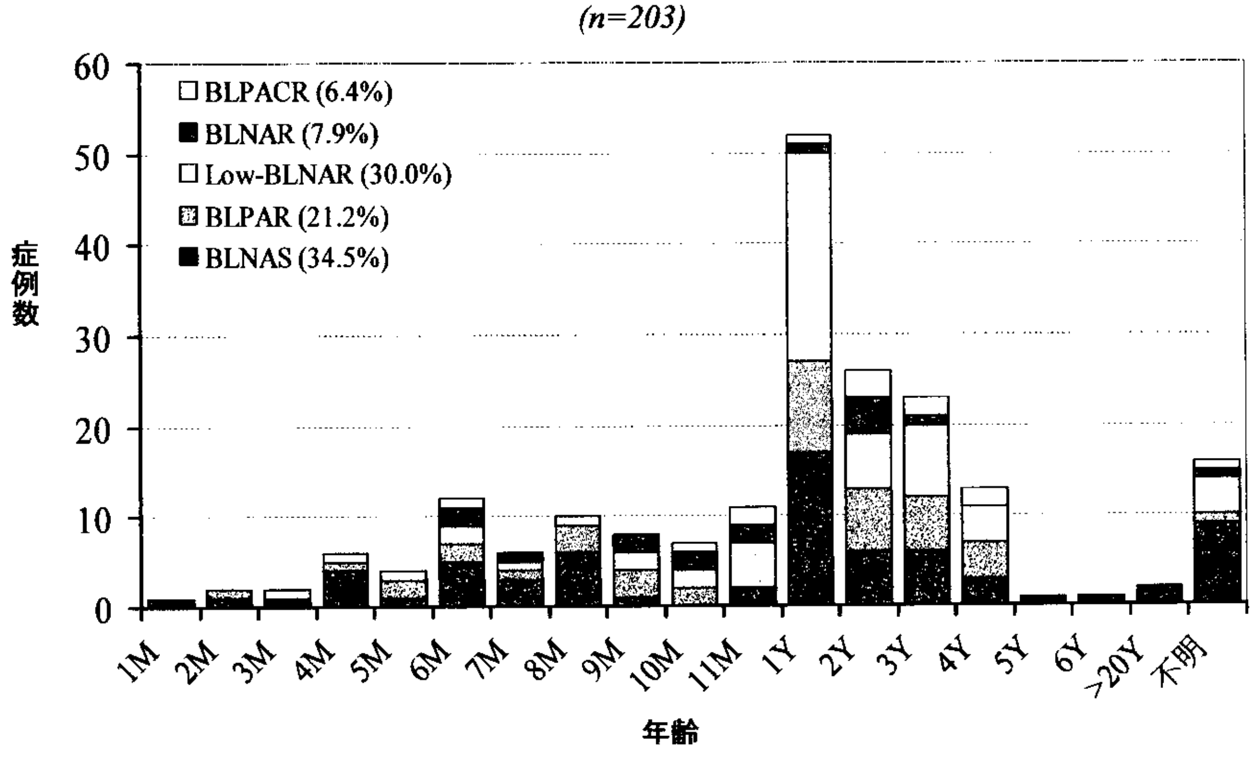


Figure 8. インフルエンザ菌性髄膜炎の患者年齢と遺伝子学的にみた耐性菌の割合



「新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の
解析及び迅速・簡便検出法に関する研究」

β-ラクタム薬加水分解酵素（β-ラクタマーゼ）産生菌の検出法の検討

分担研究者：井上松久（北里大学医学部微生物学）
研究協力者：岡本了一

要旨

グラム陰性桿菌にβ-ラクタム系薬耐性菌の耐性機構について、β-ラクタマーゼに焦点を当てて検討した。その結果、染色体性の class C 型酵素産生菌では酵素産生調節遺伝子の変異により多量に酵素を産生することで耐性化することが明らかになった。一方、class B や class A 型酵素産生菌では構造遺伝子の変異により、今まで加水分解しなかった薬剤を加水分解することで耐性化することが明らかになった。また、これらの耐性菌を確実に検出する方法についても検討した。

A.研究目的

グラム陰性各菌種は、染色体上に class C 型β-ラクタマーゼの構造遺伝子 *ampC* を保有している。そのため、医療現場におけるセフェム系薬の使用量と共に臨床分離菌から AmpC を多量に産生するセフェム系薬耐性菌の分離率が増加傾向にある。この背景には、*Escherichia coli* や *Klebsiella pneumoniae* など一部の菌種を除くと殆どのグラム陰性桿菌は、幾つかの遺伝子によって調節される誘導型酵素の構造遺伝子 *ampC* を保有することと関係すると推定されているが、詳細は不明である。そこで、この AmpC 多量産生の遺伝的背景を *Enterobacter cloacae* の *ampC* あるいは *ampR* のクローンを用いて検討することを当研究目的とした。

また、この研究をスタートさせた際、典型的な class A 酵素である TEM 型や SHV 型酵素産生菌に効力を発揮するとされてきた第二世代セフェム系薬以降のセフェム系薬を加水分解する質的変異型酵素（ESBL、extended-spectrum β-lactamase）あるいはカルバペネム系薬を基質とする class B 型酵素の構造遺伝子 bla_{IMP} の変異型酵素も分離され始めていることが判った。そこで、かかる新規の耐性菌を迅速に検出し、見逃さない方法についても研究を始め、幾つかの成果を得た。

B.研究方法

1）class C 型β-ラクタマーゼ

AmpC 多量産生の遺伝的背景を知るため、*Enterobacter cloacae* 由来の *ampR-ampC* および *ampC* クローンを材料とした。野生型の *ampR-ampC* を保有する pKU403 およおび *ampR* 領域を欠損させた pKU402 を保有する *ampD* 変異大

腸菌を宿主として代表的なセフェム系薬 ceftazidime(CAZ)を用いて検討した。

2）class B 型β-ラクタマーゼ

カルバペネム系薬耐性の *S. marcescens* 由来のプラスミド pKU501 を用いて、bla_{IMP} の塩基配列と酵素活性を測定した。

3）class A 型β-ラクタマーゼ

韓国で分離された ESBL 産生菌を用いて、ディスク法による ESBL 産生菌の検出法について検討した。また、日本で検出される Toho-1 や Kit-1 など CTX-M ファミリー属する ESBLs の PCR による型別の検討を行った。

C.研究成果および考察

1）class C 型β-ラクタマーゼ

グラム陰性各菌種は、染色体上に誘導型 class C 型β-ラクタマーゼの構造遺伝子 *ampC* を保有しているため、臨床分離グラム陰性桿菌からは AmpC を多量産生するセフェム系薬耐性菌が選択される可能性は大である。事実、かかる耐性菌が分離され、院内感染の原因ともなり治療上問題となっている。この AmpC 多量産生の遺伝的背景を知るため、*Enterobacter cloacae* の *ampC* あるいは *ampR-ampC* クローンを保有する *ampD* 変異株を宿主として代表的なセフェム系薬 ceftazidime(CAZ)を用いて耐性菌の選択を試みた。その結果、DNA 結合タンパク質 *ampR* を欠く pKU402 から CAZ 高度耐性菌は分離されなかった。一方、pKU403 からは、CAZ 選択により CAZ 高度耐性菌が 10^{-6} 頻度で分離され、得られた変異株から MIC 型の異なる変異株として任意に pKU404、pKU405 および pKU406 4 株選び、詳細に調べた。その結果、変異株 4 株は、親株 pKU403 に比べて AmpC 量は 70-450 倍の活性を示した。各変異株の DNA 塩基配列を調べた結果、AmpR 領域に変異が認められ、pKU404 は Arg86Cys, pKU405 は Asp135Asn、pKU406 は Asn135Val にそれぞれアミノ酸置換していた。AmpC 量が極端に低い臨床分離の *E.cloacae* にこの変異株 pKU404, pKU405 および PKU406 を形質転換させると、AmpC 量は著しく増量した(AAC 報告済み)。また、この AmpR 変異をクローン化し、pKU403 と共存させるとその AmpC 量が著しく増えることが判った。この結果は、*ampR* 変異は野生株 *ampR* に対して優性であることを示しており、臨床分離菌にかかる遺伝子を形質転換させることで、class C 酵素産生変異株の一部を同定できるなどの応用も考えられる。DNA 結合蛋白質 AmpR は、*ampC* の転写を活性化させる因子であり、その活性化は *ampG* を介して取りこまれるシグナル物質が関わっていると推定されている。そこで、*ampG* 欠損株を用いて、*ampR* 変異の機能を調べた。その結果、*ampG* 欠損株ではシグナル物質が取りこまれないため pKU403 の AmpC の発現は全く認められなかった。一方、*ampR* 変異株 pKU404

、pKU405 および pKU406 の AmpC の発現量は *ampG* 保有株と *ampG* 欠損株間でほぼ同程度で、十分量検出された（AAC 投稿中）。以上の結果から、プラスミド化された *ampR-ampC* クローンは、宿主が AmpD 変異株でない限り一般のグラム陰性桿菌では発現しないが、*ampR* 変異は宿主が野生型あるいは変異型の AmpD に関わらず発現し、耐性菌汚染の原因となり得ること、およびセフェム薬高度耐性化の一つの因子として *ampR* 遺伝子変異の関わりが大きいことが判った。今後、さらにかかる変異菌を選択し易いセフェム系薬を特定する必要がでてきた。また、pKU403 を保有する *ampD* 野生株から CAZ 耐性変異株は 10^{-7} 頻度で分離され、その一部には AmpC 酵素活性が認められており、この点については継続して現在検討中である。

2）class B 型 β-ラクタマーゼ

さらに、IPM, panipenem (PAPM), biapenem (BIPM) あるいは meropenem (MEPM) などの carbapenem 系薬はその外膜透過性が良好なため、bla_{IMP} プラスミドを保有する *E.coli* では carbapenem 系薬の MIC はせいぜい 1-2 μ g/mL である。一方、*P. aeruginosa* や *S. marcescens* は、それ自体クラス C 型酵素を誘導的に産生し易い菌種であるし、プラスミド支配の bla_{IMP-1} 遺伝子保有菌ではクラス B 型酵素と誘導された classC 型酵素によって CAZ がそれぞれ加水分解されるため高い MIC を示す傾向にある。われわれが初めて bla_{IMP} プラスミドを報告した 1990 年当時は、培養中に bla_{IMP} プラスミドが宿主から高頻度に脱落して感受性化するため、将来的には問題にならないと考えた。ところが、*S. marcescens* から検出される bla_{IMP-6} プラスミドは培養中も安定であり、且つ MIC も IPM 32 μ g/mL、MEPM ≧128 μ g/mL を示す菌株が分離されてきている。かかるプラスミドを *E.coli* に形質転換し MIC を調べると IPM 2 μ g/mL, MEPM 64 μ g/mL とを示し、これまでの bla_{IMP-1} プラスミドに比べて IPM と MEPM の MIC が逆転している。そこで bla_{IMP-6} の DNA 塩基配列を調べた結果 bla_{IMP-1} の 640 番目の A が G に変わり、それに伴って 196 番目のアミノ酸も S196G と変異していた。この変異に伴なって classB 型酵素の基質特異性も大きく異なっており、MEPM は IPM の 7 倍加水分解されやすいことが判った。また、bla_{IMP-6} の penicillinG、piperacillin の加水分解率は bla_{IMP-1} に比べて約 3-9 倍となっていた（AAC、報告済み）。このことは、前述した bla_{IMP-1} の検出濃度（*P. aeruginosa* において IPM≧64 μ g/mL; *S. marecescens* では IPM≧8 μ g/mL ）の設定では不充分であり、IPM と MEPM の両者の薬剤を用いなければならないことが判った。

3）class A 型 β-ラクタマーゼ

クラス A 型酵素を産生する *Escherichia coli* や *K. pneumoniae* は、ABPC や PIPC に対して高度耐性を示すだけでなく CEZ や CER に対して中等度から高度耐

性を示す場合がある。一般に、*E.col i* 感受性菌に対して CPDX や CAZ では≦ 0.03-0.25 μg/mL であるが、クラス A 型酵素を産生する *E. coli* に対しては CPDX や CAZ の MIC は 0.5-1 μg/mL であり、感受性菌の MIC に比べて 4-16 倍高くなる。特にクラス A 型酵素の質的に変異した Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBLs)産生菌は、抗菌スペクトルの広い第三・四世代セフェム系薬をも加水分解し、院内感染菌として問題となっている。そのため、検査室等での迅速な鑑別が重要となる。NCCLS による ESBL の定義では、感受性の *E. coli*、*K. pneumoniae* あるいは *K. oxytoca* などの菌種に対するセフェム系薬の MIC は、cefotaxime (CTX, 0.06 μg/mL), ceftazidime (CAZ, 0.25 μg/mL), cefpodoxime (CPDX, 0.5 μg/mL)であるが、ESBL 産生菌になると CTX≧1 μg/mL, CAZ≧2 μg/mL, CPDX≧4 μg/mL を規定している。そこでかかる菌株をデイスク法による阻止円から検出する場合には CPDX は 20mm をブレイクポイントとすることが妥当との結論を得た。しかし、CTX や CAZ を用いた場合には感受性菌と ESBL 産生菌のデイスク法での確認は、比較的困難であり、識別できない可能性が考えられた。そこで、かかる薬剤を用いて識別する場合は、クラス A 型酵素の阻害薬である clavulanic acid (CVA)や sulbactum (SBT)、あるいは tazobactam (TAZ)の存在下でセフェム系薬に対する阻止円の変動を確認することで ESBL 産生菌と判定する必要がある。この際、ESBL 産生菌に対して cefmetazole (CMZ)や cefminox (CMNX) などの cephamycin 系薬に対して感受性を示すことなどを確認することなどを韓国との協同実験で行い報告した（JCM,報告済）。

我が国においては CTX-M 型（Toho 型あるいは Kit-1 型など）と呼ばれる酵素が多く見つかっている。既に報告されている CTX-M 型遺伝子をその DNA 相同性から分類すると、大きく 4 つのグループに分けることができる。そこで CTX-M 型遺伝子を PCR によりグループに分けて検出する方法について検討した。その結果、共通プライマー用いることにより、Toho-1、Kit-1、CTX-M14 のいずれも共通の断片が増幅され、その断片の制限酵素によるパターンでグループ分けできることが判った。CTX-M 型酵素産生が疑われる臨床株 19 株について検討したところ、すべての株で 590bp 断片が増幅され、G1：9 株、G3：4 株および G4：6 株が確認されたことから共通プライマーを用いた PCR による CTX-M 型遺伝子のグループ分類の可能性が示唆された（継続検討中）。

D.研究発表

学会誌

1） Kuga A.,R.Okamoto and M.Inoue. *ampR* gene mutations that greatly increase class C β-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 44: 561-567,2000

2） Yano,H., A.Kuga, R.Okamoto, H.Kitasato, T.Kobayashi and M.Inoue. A

plasmid-encoded metallo-β-lactamase(IPM-4) that confer expanded-spectrum carbapenem resistance. Antimicrob Agents Chemother 45(5):1343-1348,2001

3) Lee,K., J.K.Lim, D.Yong, J.Yum.Y.Chong, R.Okamoto and M.Inoue. Evaluation of efficacy of screening extended-spectrum β-lactamase-producing *Esvherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* where bacteria are increasingly prevalent. J Clin Microbiol.39:3696-3699,2001.

4) Ida,T., C.Shimauchi, R.Okamoto and M.Inoue. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Clin Microbiol 39(9) : 1401- 1409, 2001

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

『新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法に関する研究』

クラスCβ-ラクタマーゼを不活化する抗菌薬に関する検討

分担研究者　　山口　惠三　東邦大学医学部微生物学講座　教授

研究要旨　Cefcapene および Cefpodoxime は経口セファロスポリン系抗菌薬である。本研究で私たちは cefcapene と cefpodoxime の異なるクラスのβ-ラクタマーゼに対する安定性を評価した。。クラスA型β-ラクタマーゼである TEM-1、SHV-1 および NMC-A は k_{cat}/Km 値のみ算出された。なぜならば、これらの酵素の cefpodoxime および cefotaxime に対する Km 値が非常に大きいからである。クラスB型β-ラクタマーゼである L1、IMP-1 および CcrA は、ほぼ同様の k_{cat}/Km 値を示した。しかしながら、*Enterobacter cloacae*、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa* および *Citrobacter freundii* 由来のクラスC 型β-ラクタマーゼにおいて、私たちは両化合物間の大きな違いを見出した。Cefpodoxime は *E. cloacae* 由来のクラスCβ-ラクタマーゼを除く酵素に対する良好な基質として作用した。なぜならば、k_{cat} および *Km* 値を算出することができたからである。一方、cefcapene はクラスCβ-ラクタマーゼに対する poor substrate および不活化剤として作用した。すなわち、k2/K 値が決定されたからである。k_3 値は *P. aeruginosa* および *C. freundii* 由来β-ラクタマーゼで決定された。これらの結果は、クラスCβ-ラクタマーゼに対する阻害剤がセフェム系化合物から作り出される可能性を示唆している。

研究協力者
石井良和　東邦大学医学部微生物学講座

A. 研究目的

β-ラクタマーゼはβ-ラクタム系抗菌薬に対する細菌の主要な耐性機構の一つである。それらの酵素は、Ambler によって 4 つの異なるクラスに分類されている。クラス A、C および D はそのβ-ラクタマーゼ活性に Ser-70 が必須のアミノ酸である。一方、クラスB型酵素は亜鉛イオンがその活性にきわめて重要である。通常、グラム陰性菌ではクラスAおよびクラスD型β-ラクタマーゼはプラスミドによってコードされており、クラスC型β-ラクタマーゼは染色体によってコードされている。最近、何人かの研究者がプラスミドによってコードされる MOX-1、FOX-型、LAT-型あるいは CMY-型クラス Cβ-ラクタマーゼを発見した。クラスB、クラス C およびクラスDβ-ラクタマーゼは腸内細菌科のみならず *Pseudomonas aeruginosa* あるいは *Acinetobacter baumanii* などのブドウ糖非発酵菌にも分布している。一方、クラス A 型β-ラクタマーゼはさらに広範に分布しており、分布範囲はグラム陰性菌から Streptococci を除くグラム陽性菌にまで及んでいる。通常、クラスAおよびクラスDβ-ラクタマーゼはクラブラン酸、スルバクタムあるいはタゾバクタムのようなβ-ラクタマーゼ阻害剤によって阻害を受けるが、クラスBおよびクラス Cβ-ラクタマーゼを現在汎用されているβ-ラクタマーゼ阻害剤で阻害することは困難である。クラスBβ-ラクタマーゼの活性は EDTA、2,6-pyridinedicarboxylic acid、succinic acid あるいは mercaptocarbaxylate によって阻害されるが、私たちは現在に至るまでクラスB型酵素産生株に対して臨床で使用することのできる阻害剤を有していない。Monobactam 系、carbapenem 系およびいくつかの penicillin 系化合物はクラス Cβ-ラクタマーゼを阻害する。最近、何人かの研究者が新しいクラス Cβ-ラクタマーゼ阻害剤に関する報告をしている。しかしながら、経口の cephem 系抗菌薬がクラス Cβ-ラクタマーゼの活性を不活化するとの報告はなされていない。現在までの私たちの予備実験の結果から、cefcapene がクラス C に属するβ-ラクタマーゼを不活化する可能性が示唆されている。今回は、経口 cephem 系抗菌薬である cefcapene および cefpodoxime を用いて、これらの抗菌薬のクラスCβ-ラクタマーゼに対する不活化作用に関して詳細に検討す

ることを目的として今回の研究を実施した。

B. 研究方法

β-ラクタマーゼおよび抗菌薬

全てのβ-ラクタマーゼは精製された標準品をLiege 大学理学部タンパク質工学研究センター（ベルギー、リエージュ）より分与を受けた。クラス Aβ-ラクタマーゼとして TEM-1、TEM-18、SHV-1、Toho-1 および NMC-A を使用した。*Stenotorophomonas maltophilia* が産生する L1,IMP-1 および *Bacteroides fragilis* が産生する CcrA をクラス Bβ-ラクタマーゼとして使用した。クラス Cβ-ラクタマーゼは *Enterobacter cloacae*908R、*Escherichia coli* K12、*C. freundii* OS60 および *Pseudomonas aeruginosa* 18SH が産生する酵素を使用した。さらに、クラスDに属する酵素は、PSE-2(OXA-10)を使用した。Cefcapene ($\Delta\varepsilon_{262}$=8,500$M^{-1}cm^{-1}$)は塩野義製薬株式会社(大阪)、cefpodoxime ($\Delta\varepsilon_{261}$=10,000$M^{-1}cm^{-1}$)は三共株式会社（東京）からそれぞれ分与された力価の明から標準品を使用した。Nitorocefin($\Delta\varepsilon_{482}$=15,000$M^{-1}cm^{-1}$) は Unipath Oxoid(Basingstoke、英国)から購入した。

β-ラクタマーゼの酵素学的検討

Cefcapene および cefpodoxime の加水分解は、クラス Bβ-ラクタマーゼ以外の酵素に対しては、50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)中で吸光度変化をモニターすることで確認した。クラスBの酵素は、50mM MOPS 緩衝液 (pH7.0)を用いて酵素学的パラメータを求めた。コンピュータ制御型自記吸光光度計 UV-2550(島津製作所、京都)で、反応液の総量、500μL、反応温度 30℃の条件で全ての測定を実施した。また、酵素の変性を防止する目的で最終濃度 20μg/ml の牛血清アルブミンをβ-ラクタマーゼ希釈液中に添加した。好適基質の酵素学的パラメータとしては、基質を完全に分解するまでの吸光度のタイムコースを取り、その値を Michaelis-Menten 方程式に代入して k_{cat} および Km を求めた。基質濃度は基質によって異なるが、10μM から 1mM の範囲を用いた。非好適基質の場合は、リポーター基質としてニトロセフィンを用いた。

C. 研究結果

クラス A、クラス B およびクラス Cβ-ラクタマーゼの cefcapene および cefpodoxime に対する k_{cat} および Km 値は Table 1 に示した。Toho-1 を除くクラス Aβ-ラクタマーゼは、cefcapene および cefpodoxime に対して k_{cat}/Km 値のみが算出可能であった。すなわち、TEM-1、TEM-18、SHV-1 および NMC-A は大きな Km 値を有していた。クラス B のβ-ラクタマーゼである L1、IMP-1 および CcrA の cefcapene に対する Km 値は、それぞれ 4.9 μM、3.2 μM および 7.4 μM を示した。一方、cefpodoxime は cefcapene と比較して Km 値が大きかった(L1: 110 μM、IMP-1: 37 μM、CcrA: 15 μM)。クラスBβ–ラクタマーゼの両基質に対する k_{cat} 値は 19 s^{-1} から 430 s^{-1} であった。クラス Dβ-ラクタマーゼの一つである PSE-2 (OXA-10)の cefcapene と cefpodoxime に対する k_{cat}/Km 値は 470 $M^{-1}s^{-1}$ および 500 $M^{-1}s^{-1}$ を示した。しかし、各基質の k_{cat} 値および Km 値は異なっていた。Table 2 にクラス Cβ-ラクタマーゼの cefcapene および cefpodoxime に対する酵素学的パラメータを示した。*E. coli*、*P. aeruginosa* および *C. freundii* 由来 AmpC の cefpodoxime に対する k_{cat} は、それぞれ 0.3 s^{-1}、1.3 s^{-1} および 1.2 s^{-1} と小値を示した。しかし、各 AmpC の cefpodoxime に対する Km 値が小さいため (0.1 μM から 2.1 μM)、k_{cat}/Km 値は小さかった。Cefcapene の場合、酵素学的パラメータとして脱アシルスピードである k_3 およびアシル中間体形成定数である k_2/K が算出された。*P. aeruginosa* および *C. freundii* 由来のクラス Cβ-ラクタマーゼに対する cefcapene の k3 値はそれぞれ 0.02 s^{-1} および 0.21 s^{-1} であった。*E. cloacae*、*E. coli*、*P. aeruginosa* および *C. freundii* 由来クラス Cβ-ラクタマーゼの cefcapene に対する k_2/K は、それぞれ 7.0 $\mu M^{-1}s^{-1}$、87 $\mu M^{-1}s^{-1}$、1.4 $\mu M^{-1}s^{-1}$ および 6.7 $\mu M^{-1}s^{-1}$ であった。

D. 考察

β-ラクタマーゼの加水分解反応はシェーマ 1 によって説明されている。E・S*は acylenzyme intermediate の形成を意味し、E は酵素、S は基質としてのβ-ラクタム系抗菌薬、E・S は Henri-Michaelis complex、E・S*は Acylenzyme、P は加水分解による生成産物を示している。Steady-state パラメータの性質は以下のモデル（公式）から導き出される。さらに、k_{cat}/Km と k_2/K の意味はほぼ同じで acylation rate を表す。

$$E + S \overset{k_{-1}}{\underset{k_1}{\Leftrightarrow}} E\cdot S \xrightarrow{k_2} E\cdot S^* \xrightarrow{k_3} E + P$$

Scheme 1

上記モデルにおける今回用いた酵素学的パラメータの関係は以下のとおりである。

$$k_{cat} = k_2 \cdot k_3 / k_2 + k_3$$

$$Km = k_3 \cdot K / k_2 + k_3$$

$K = k_{-1} + k_2 / k_{+1}$

さらに k_{cat}/Km (=k_2/K)はアシル結合形成定数を意味する。

今回の検討で、cefcapene も cefpodoxime もクラスAおよびクラス Dβ-ラクタマーゼに対しては、ほぼ同様の戦略で安定性を獲得していた。すなわち、cefcapene および cefpodoxime は、Toho-1 を除くクラスAおよびクラスD型β-ラクタマーゼに対して高い親和性を示さなかった（低い *Km* 値)。したがって、cefcapene および cefpodoxime はクラスAおよびクラスD産生株に対して概ね有用であると思われた。しかしながた、両化合物はクラスB型β-ラクタマーゼ産生株には無効であることが確認された。Cefcapene および cefpodoxime はクラス C 型β-ラクタマーゼに異なる戦略で安定性を示した。Cefpodoxime はクラス Cβ-ラクタマーゼに対して小さな kcat 地を示した。Cefcapene は poor substrate および不活化剤として作用した。すなわち、我々は、cefcapene の今回使用したクラス Cβ-ラクタマーゼに対する k_{cat} および *Km* 値を算出することができなかった。最近、クラスBやクラス Cβ-ラクタマーゼに対する阻害剤に関する報告がなされている。それらの化合物はセフェム系の化合物ではない。我々はここにセフェム系化合物の一つである cefcapene がクラス Cβ-ラクタマーゼに対して特異的な阻害剤になる可能性を示した。しかしながら、cefcapene は *P. aeruginosa* および *C. freundii* が産生するクラス C 型β-ラクタマーゼに対する k_3 値が算出され、さらに我々はいずれの酵素との反応においても、酵素の再活性化反応としての一時的不活化現象を認めた。すなわち、cefcapene のクラス Cβ-ラクタマーゼを不活化する作用は十分であるとはいえないことを示している。

今回の検討では、我々はβ-ラクタマーゼの酵素学的検討のみを実施した。さらに、今回用いたクラス Cβ-ラクタマーゼとして染色体によってコードされている酵素のみを使用した。したがって、今後はプラスミドによってコードされているβ-ラクタマーゼを用いた酵素学的検討および異なるクラス Cβ-ラクタマーゼ産生株を用いた薬剤感受性試験などを実施する必要があるものと考えられた。今回の結果がセフェム系骨格を有する化合物を用いてクラス Cβ-ラクタマーゼに対する選択的阻害剤のデザインの可能性を示唆していることを再度強調したい。

E. 結論

Cefcapene は、今回使用した全てのクラス C 型β-ラクタマーゼの不活化剤として作用した。すなわち、好適基質の酵素学的パラメータである *Km* および k_{cat} を求めることができず、代わって k_2/K、k_3 が算出された。Cefcapene の酵素不活化作用は一時的なものであり、不可逆的なものではなかったが、今後 cephem 系抗菌薬の誘導体からβ-ラクタマーゼ阻害剤を作成することができる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

石井良和、アルバ　ヒメナ、満山順一、山口惠三. (2001) 各種基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生株に対するβ-ラクタマーゼ阻害薬の阻害効果の比較. 日本化学療法学会雑誌. 49: 562-564.

Ma L, Matsuo H, Ishii Y and Yamaguchi K. (2002) Characterization of cefotazime-resistant *Escherichia coli* isolates from a nosocomial outbreak at three geriatric hospitals. Journal of Infection Chemotherapy (in press)

Ishii Y, Galleni M, Alba J, Frere J-M and Yamaguchi K. Cefcapene inactivates chromosome-encoded class C beta-lactamases. Journal of Infection Chemotherapy (submitted)

Ma L, Ishii Y, Chang F-Y, Yamaguchi K, Ho M and Siu LK, Characterization of CTX-M-14: a plasmid-Mediated CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase isolated from *Escherichia coli.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy (submitted)

2. 学会発表

石井良和、山口惠三. Cefcapene はクラス Cβ-ラクタマーゼを不活化する. 第49回日本化学療法学会総会(2001 年 5 月　横浜)

石井良和、馬　霊、山口惠三. Cefotaxime 分解型β-ラクタマーゼ(CTX-M-14)の基質特異性に関する検討. 第48回日本化学療法学会東日本支部総会(2001 年 11 月　東京)

Alba J, Ishii Y, Galleni M, Yamaguchi K and Frere J-M. Different kinetic behavior between chromosomal and plasmid borne class C beta-lactamases towards cefcapene. 41th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotehrepy. (2001, Dec. Chicago)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

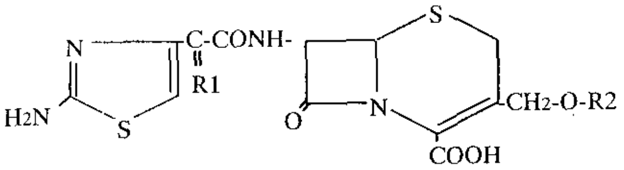
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Figure 1.



	R1	R2
Cefcapene	C-C2H5 (H)	CONH2
Cefpodoxime	N-OCH3	CH3

Table 1. Kinetic parametors of class A, B and D β-lactamases against cefcapene and cefpodoxime

	Cefcapene			Cefpodoxime		
Enzyme	*Km* or *Ki*	k_{cat}(s^{-1})	k_{cat}/Km($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	*Km* or *Ki*	k_{cat}(s^{-1})	k_{cat}/Km($M^{-1}\cdot s^{-1}$)
Class A						
TEM-1	-	-	$9.6x10^{5*}$	-	-	$8.5x10^{4*}$
TEM-18	460 μM	0.1	220	-	-	480*
SHV-1	-	-	$1.0x10^{6*}$	-	-	$1.1x10^{7*}$
Toho-1	46 μM	100	$2.2x10^{6}$	25 μM	110	$4.4x10^{6}$
NMC-A	-	-	3100*	-	-	3800*
Class D						
PSE-2(OXA-10)	340 μM	0.2	590	1.2 mM	0.6	490
Class B						
L1	4.9 μM	430	$8.8x10^{7}$	110 μM	300	$2.7x10^{6}$
IMP-1	3.2 μM	19	$5.6x10^{5}$	37 μM	51	$1.4x10^{6}$
CcrA	7.4 μM	41	$5.5x10^{6}$	15 μM	79	$5.4x10^{6}$

* First order kinetic

Table 2. Kinetic parametors of class C β-lactamases against cefcapene and cefpodoxime

	Cefcapene		Cefpodoxime		
Enzyme	k_3(s^{-1})	k_2/K($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	*Km* or *Ki*	k_{cat}(s^{-1})	k_{cat}/Km($M^{-1}\cdot s^{-1}$)
Class C					
Enterobacter cloacae 908R	ND	$7.0x10^{6}$	0.3 μM	ND	
Escherichia coli K12	ND	$8.7x10^{5}$	1.7 μM	0.3	$1.8x10^{5}$
Pseudomonas aeruginosa	$2.3x10^{-3}$	$1.4x10^{6}$	2.1 μM	1.3	$6.2x10^{5}$
Citrobacter freundii	$2.1x10^{-1}$	$6.7x10^{6}$	0.1 μM	1.2	$1.2x10^{7}$

ND: not detected

k_2/K was computed was k_{cat}/Km