

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

ニューキノロン薬耐性菌の耐性遺伝子の解析並びに耐性メカニズムに関する研究

分担研究者：山本 友子（千葉大学大学院薬学研究院）

### 研究要旨

近年、最も繁用されている抗菌薬のひとつであるニューキノロン薬に対する耐性化の現況を、2000年4月～2001年3月に分離された臨床分離株を用いて明らかにした。*E. coli* 高度耐性株の耐性機構を明らかにするために、標的酵素のサブユニットである GyrA と ParC のキノロン耐性決定領域 QRDR のアミノ酸配列をを検討したところ、従来の変異に加え新たな変異部位が確認された。耐性メカニズム研究の新しいアプローチとして、ニューキノロン薬に曝露された大腸菌が新たに合成する蛋白質のプロテオーム解析を行った。ニューキノロン薬に応答して誘発される蛋白質の中で Lon プロテアーゼを欠損させると、ニューキノロン薬に著しく感受性化することが明らかとなった。

厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症事業)

分担研究報告書

ニューキノロン薬耐性菌の耐性遺伝子の解析並びに耐性メカニズムに関する研究

分担研究者：山本 友子 (千葉大学大学院薬学研究院)

## 研究要旨

近年、最も繁用されている抗菌薬のひとつであるニューキノロン薬に対する耐性化の現況を、2000年4月～2001年3月に分離された臨床分離株を用いて明らかにした。*E. coli* 高度耐性株の耐性機構を明らかにするために、標的酵素のサブユニットである GyrA と ParC のキノロン耐性決定領域 QRDR のアミノ酸配列をを検討したところ、従来の変異に加え新たな変異部位が確認された。耐性メカニズム研究の新しいアプローチとして、ニューキノロン薬に曝露された大腸菌が新たに合成する蛋白質のプロテオーム解析を行った。ニューキノロン薬に応答して誘発される蛋白質の中で Lon プロテアーゼを欠損させると、ニューキノロン薬に著しく感受性化することが明らかとなった。

## A. 研究目的

キノロン系抗菌薬の使用は、1962年に nalidixic acid が登場したことにはじまり、以来 piromidic acid, cinoxacin, pipemidic acid が次々と開発された。これらオールドキノロン時代には、抗菌スペクトラム、尿中排泄率、代謝などの問題からキノロン薬の使用量はそれほど多くはなく、又、広域β-ラクタム薬が数多く開発され使用されていたこともあり、キノロン耐性菌の分離頻度は目立ってはいなかった。1984年の norfloxacin の登場以来、抗菌スペクトラムが広く、抗菌力が増強したニューキノロン薬が次々と開発され、組織移行性も良好なことから、種々の感染症に広く使用されるようになり、使用量は飛躍的に増大した。現在、最も繁用されている抗菌薬のひとつとなっているが、それに伴いキノロン耐性菌が増加し、臨床上の問題となっている。そこで、本研究は臨床分離ニューキノロン耐性菌のレファレンス化をめざして、耐性遺伝子の解析並びに耐性メカニズムに関する研究を行う。さらに、耐性メカニズム研究の新しいアプローチとして、抗菌薬曝露後に開始される細菌のゲノム活動の中から耐性化に寄与する因子を見いだすために、ニューキノロン薬曝露後の細菌のプロテオーム解析をあわせて行う。

## B. 方法

2000年4月～2001年3月に都内の医療機関中央検査室において種々の臨床材料より分離されたグラム陽性菌 331 株及び陰性菌 430 株に対するニューキノロン薬 (LVFX; levofloxacin, SPFX; sparfloxacin, CPFX; ciprofloxacin, GFLX; gatifloxacin) の MIC を寒天平板希釈法で測定した。又、その他 25 種の抗菌薬の MIC を微量液体希釈法を用いて測定した。キノロン標的酵素として知られている DNA gyrase と topoisomerase IV のそれぞれ遺伝子である *gyrA* と *parC* のキノロン耐性決定領域 QRDR を含む DNA を PCR により増幅し、塩基配列を解析することにより標的酵素の変異を検出した。

種々の濃度の LVFX に暴露した大腸菌を  $^{35}\text{S}$ -メチオニンで標識し、溶菌液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動あるいは 2 次元ゲル電気泳動により展開後、蛋白スポットを MALDI-TOF Mass を用いて質量解析し、Protein Database (ProFound) による同定を行った。

## C. 結果と考察

- (1) ニューキノロン耐性グラム陰性菌の比率は、*Escherichia coli* で 6 % (8 株/133 株)、*Klebsiella pneumoniae* で 2 % (2 株/100 株)、*Pseudomonas aeruginosa* で 32% (38 株/118 株)であった。分離された耐性 *E. coli* に対する MIC はすべて 16  $\mu\text{g/ml}$ ~64  $\mu\text{g/ml}$  の高値を示した。又耐性 *P. aeruginosa* の中で MIC 64  $\mu\text{g/ml}$ ~512  $\mu\text{g/ml}$  を示す高度耐性菌が全体の 73% を占めており、かなりのスピードで高度耐性化していると考えられた。一方、検査総数は少ないながら、耐性比率の高いものは、*Citrobacter koseri* 84 % (11 株/13 株)、*Serratia marcescens* 23 % (5 株/21 株)、*Proteus mirabilis* 15 % (3 株/20 株)であった。特に *P. mirabilis* で MIC 1024  $\mu\text{g/ml}$  を示した高度耐性菌が検出されたが、調べた限り他の抗菌剤に対し感受性を示した。
- (2) ニューキノロン耐性グラム陽性菌の比率は、*Staphylococcus aureus* で 70 % (64 株/91 株)、*Staphylococcus epidermidis* で 45 % (23 株/51 株)、*Enterococcus faeculis* で 31% (47 株/151 株)であった。いずれの場合も高度耐性菌であり、ブドウ球菌をはじめとするグラム陽性菌に対する抗菌力が増強された新薬で、まだ臨床利用されていない GFLX に対してもすでに高度耐性となっていた。中でも *S. aureus* の高度耐性化が突出していた (図 1)。
- (3) 高度耐性 *E. coli* 8 株の耐性機構を明らかにするために、まずキノロン標的酵

素として知られている DNA gyrase のサブユニットである GyrA のキノロン耐性決定領域 QRDR を含む領域のアミノ酸配列を解析したところ、すべての耐性菌において、従来知られている 83Ser→Leu の変異、87Asp→Lys or Asn への変異が観察された。さらに topoisomerase IV サブユニットである ParC の QRDR を含む領域のアミノ酸配列を解析したところ、83Ser→Ile or Arg の変異、84Glu→Lys に加え、新たな変異部位として 57Ser→Thr、108Ala→Thr or Val、127Lys→Glu が確認された(表1)。これらの高度耐性菌は1株を除いて、すべてが ABPC、PIPC 高度耐性であり、その中の1株は AZT 耐性であった。又 GM 耐性菌も含まれていた。

- (4) 全ゲノムシーケンスが解明されている *E.coli* W3110 を各濃度のレボフロキサシンに5分間曝露し、全菌体蛋白質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて解析した。その結果、レボフロキサシン 10 $\mu$ g/ml に曝露された菌に特異的な蛋白質の明瞭な誘発が認められた(図2)。一方、アミノベンジルペニシリンに対する曝露では顕著な誘発が認められなかった。既に我々は、抗菌剤曝露により細菌の熱ショック応答が誘発されることを見いだしている。レボフロキサシン曝露により誘発された蛋白質の中に熱ショック蛋白質を同定するため、*E.coli* W3110 の 30 $^{\circ}$ C で合成される蛋白質と 42 $^{\circ}$ C で熱ショックをかけた際に合成される蛋白質を同時に SDS-PAGE で解析比較した(図2)。その結果、顕著な誘発が見られた蛋白質の中で、分子サイズ 70kDa は DnaK、60kDa は GroEL であり、40kDa のものはレボフロキサシン曝露に特異的な蛋白であると考えられた。分子サイズ 70kDa, 60kDa, 40kDa の蛋白質それぞれについて定量した結果を図3示した。いずれも、薬剤濃度依存的に増加していることが明らかとなった。70kDa と 60kDa は熱ショック蛋白質 DnaK あるいは GroEL であると考えられたが、40kDa の蛋白質は、熱ショックをかけた後は減少していることから、40kDa の蛋白質の誘発は、熱ショックをはじめとするいわゆるストレス応答によるものではないと考えられる。レボフロキサシン応答蛋白質をプロテオーム上に同定するため、2次元ゲル電気泳動により蛋白質を展開し、BIORADPDQuest を用いてスポットを定量した後、質量分析により同定した(図4)。
- (5) キノロン薬曝露により誘発された熱ショック蛋白質の薬剤抵抗性における役割を明らかにするために、各プロテアーゼ欠損株を用いて、LVFX に対

する感受性を野生株と比較した (図 5)。その結果 Lon プロテアーゼ欠損により LVFX に著しく感受性化することが明らかとなった。

#### D. 結論

2000年4月～2001年3月に都内の医療機関において分離されたグラム陰性菌430株及びグラム陽性菌331株に対するニューキノロン薬を含む28種抗菌薬のMICを測定した。グラム陰性菌では *P aeruginosa* での耐性菌分離率が最も高く (32%)、又高度耐性菌は全体の73%を占めており、かなりのスピードで高度耐性化が進んでいると考えられる。グラム陽性菌では、*S. aureus* で70%、*S. epidermidis* で45%、*E. faeculis* で31%であり、いずれの場合も高度耐性菌であった。又まだ臨床利用されていない GFLX に対してもすでに高度耐性となった耐性菌が存在した。LVFX 暴露により誘発合成される熱ショック蛋白質の中で、Lon プロテアーゼは LVFX に対する細菌の抵抗性に関与することが明らかとなった。

表1 *E. coli* ニューキノロン高度耐性菌の GyrA, ParC サブユニットのアミノ酸変異

strain	Amino acid change		MIC (µg/ml) of		
	GyrA	ParC	LVFX	CPFX	SPFX
Ec1	83Ser→Leu 87Asp→Lys	80Ser→Arg	64	32	32
Ec2	83Ser→Leu 87Asp→Asn	80Ser→Ile	32	32	64
Ec3	83Ser→Leu 87Asp→Asn	80Ser→Ile 84Glu→Lys	32	64	64
Ec4	83Ser→Leu 87Asp→Asn	80Ser→Ile 108Ala→Thr	16	16	64
Ec5	83Ser→Leu 87Asp→Asn	80Ser→Ile 57Ser→Thr	16	32	32
Ec6	83Ser→Leu 87Asp→Asn	80Ser→Ile 108Ala→Val 127Lys→Glu	16	16	32
Ec7	83Ser→Leu 87Asp→Asn	80Ser→Ile	8	16	32
Ec8	83Ser→Leu 87Asp→Asn	80Ser→Ile	8	16	32
Ec9	83Ser→Leu 87Asp→Asn	80Ser→Ile	8	8	8

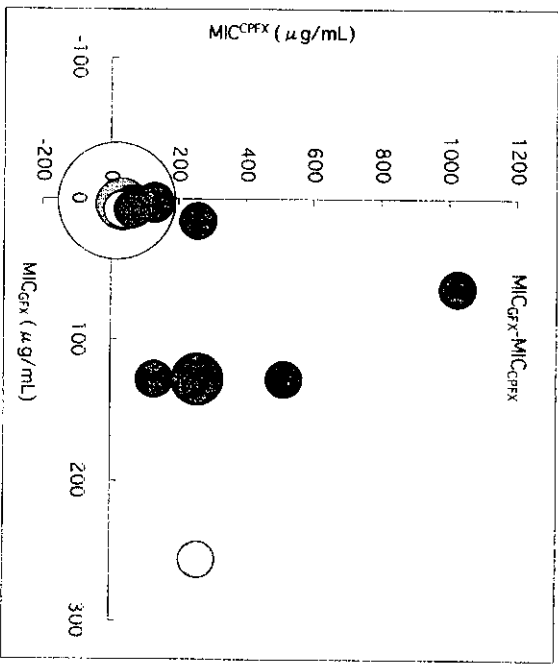
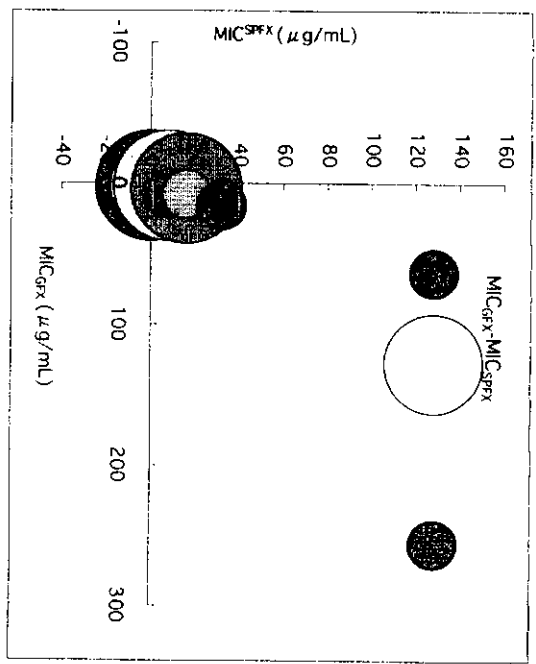
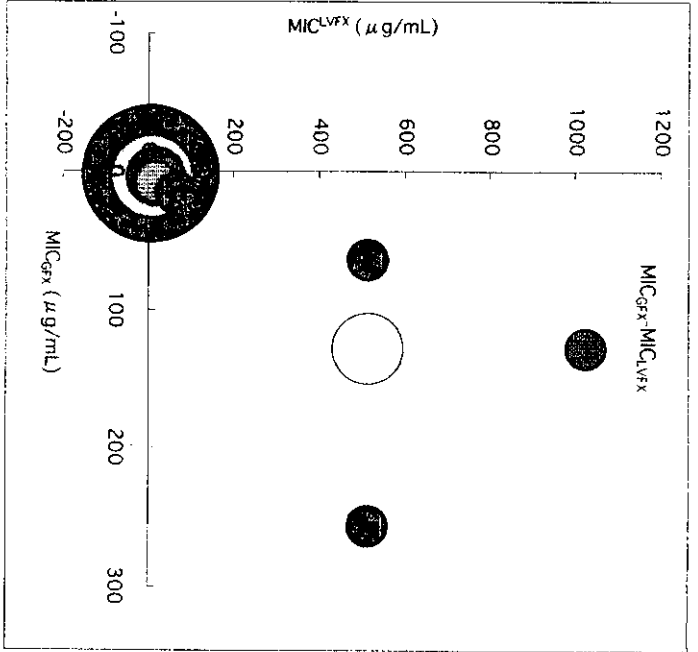
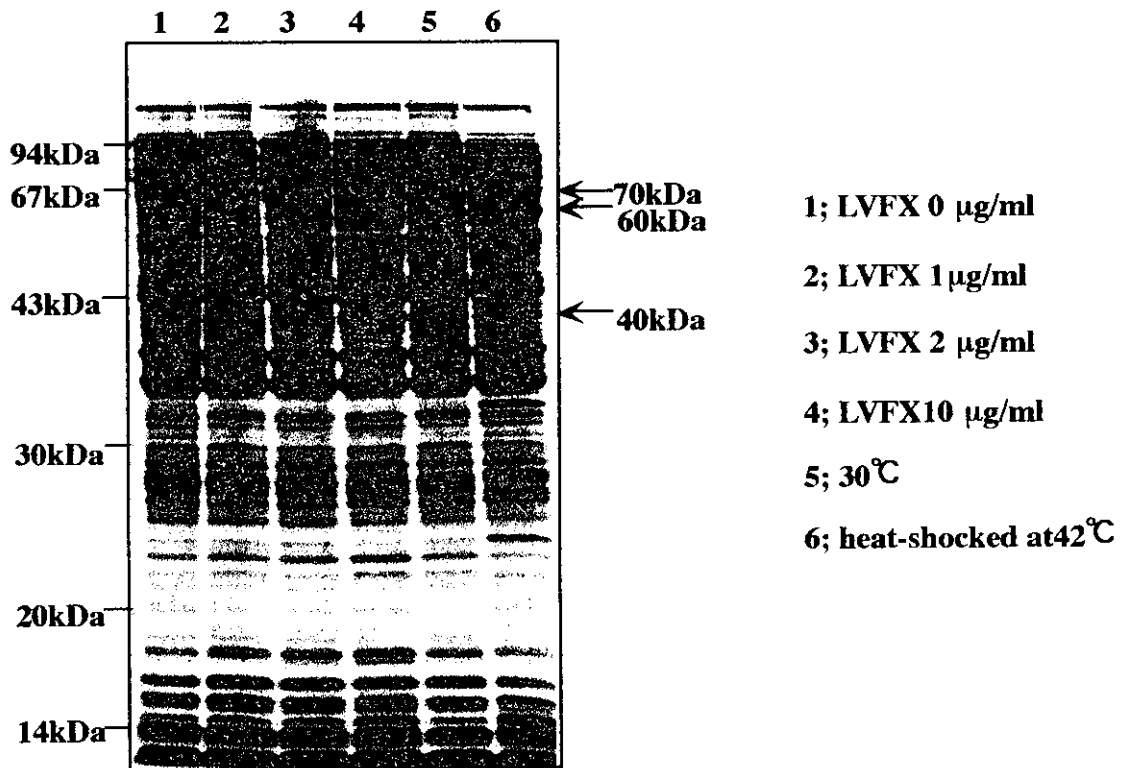
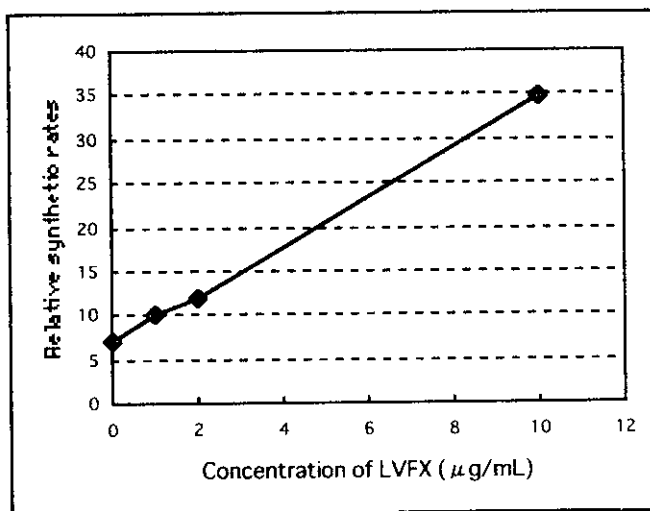


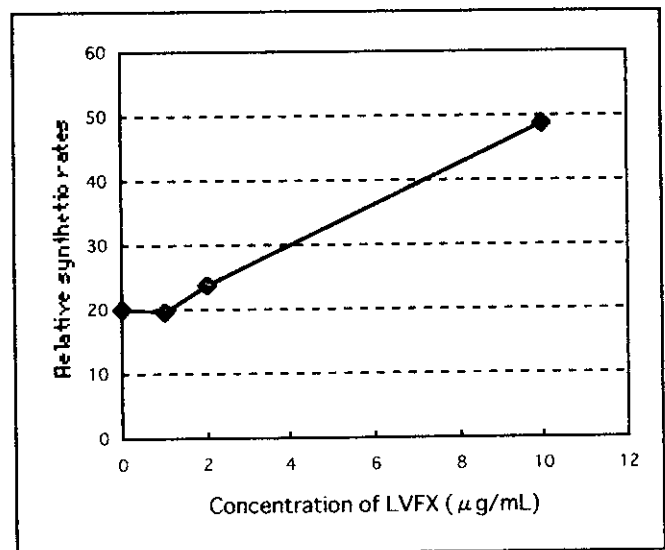
図1 *S. aureus* GPLX耐性と各種New Quinolone耐性の相関  
 円の面積は菌株数に比例する。



⊠ 2 Autoradiograph of SD-PAGE pattern of *E.coli* W3110 proteins labeled with <sup>35</sup>S-methionine after exposure to Levofloxacin (LVFX) or heat shock



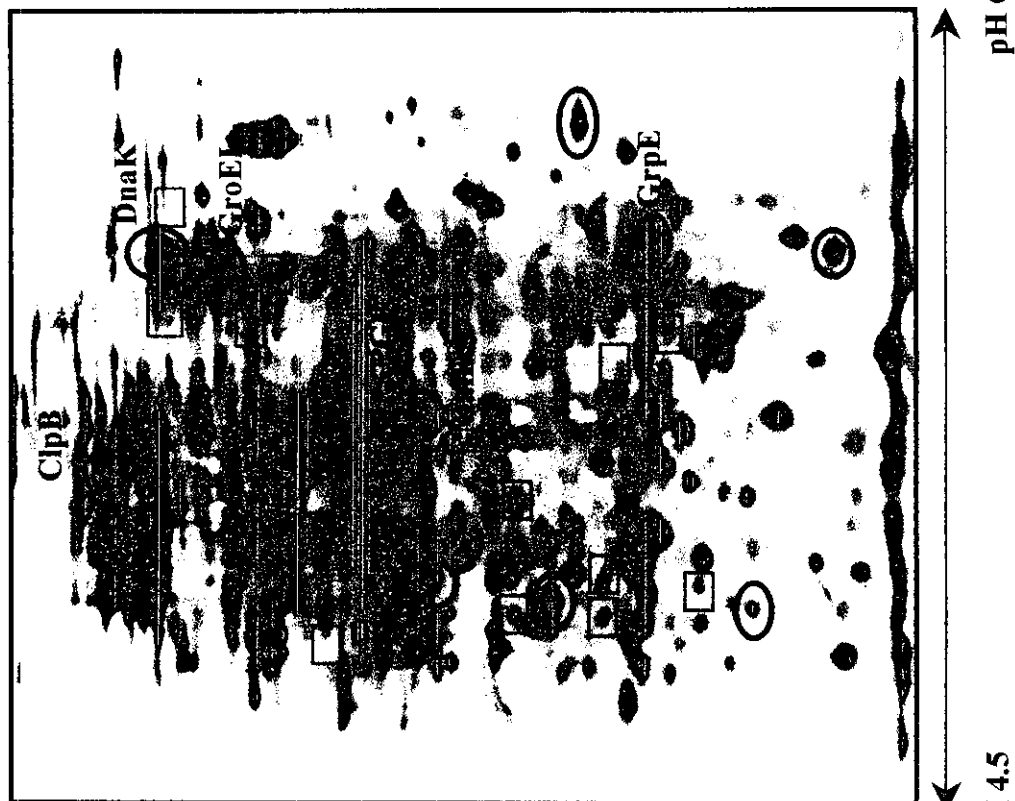
**40 kDa protein**



**60 kDa protein**

⊠ 3 Relative rates of induced proteins in *E.coli* W3110 after exposure to 10 µg of LVFX per ml for 5 min

LVFX 10  $\mu$ g/ml



LVFX 0  $\mu$ g/ml

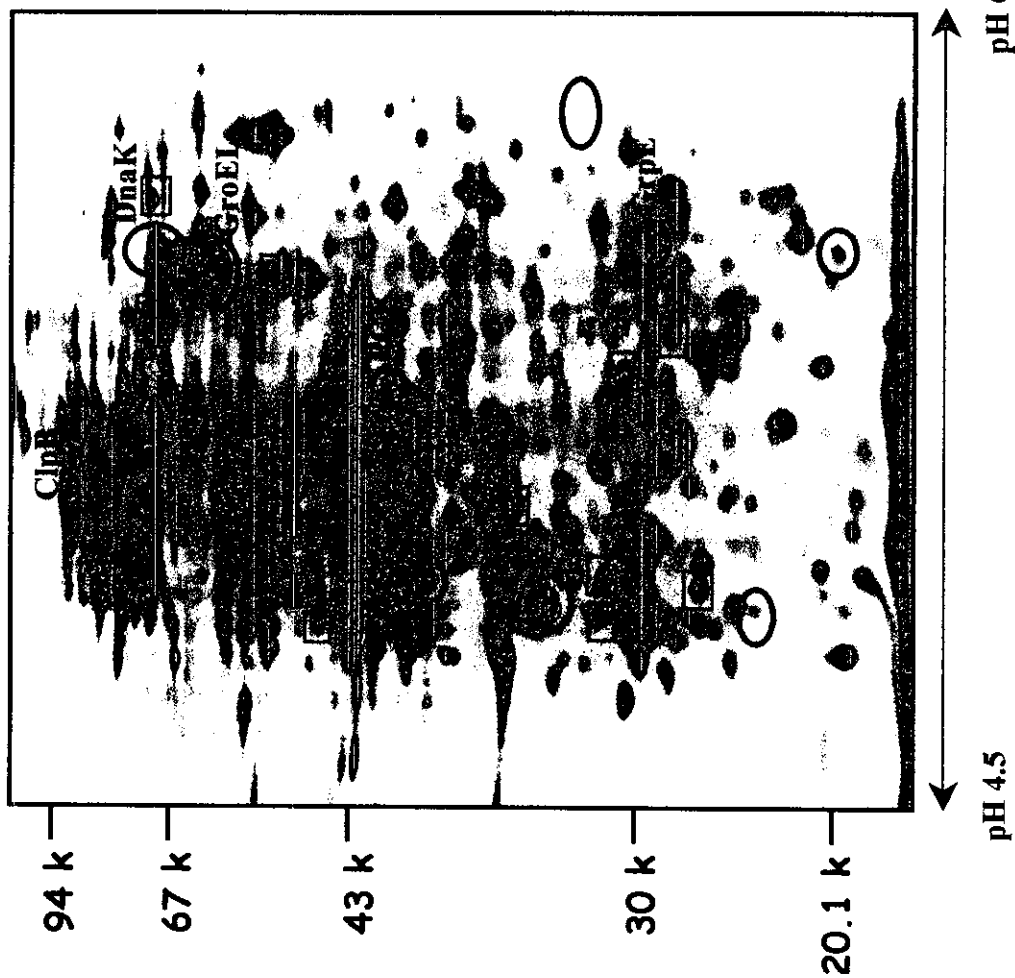
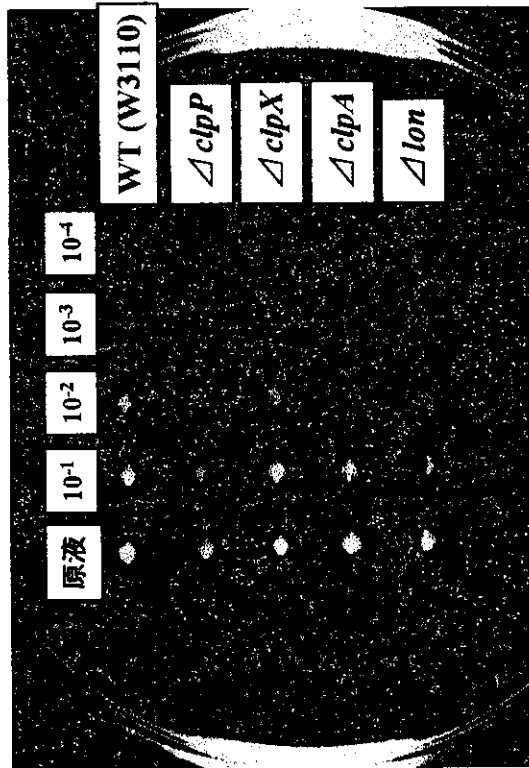


図4 LVFX処理後の大腸菌のプロテオーム解析

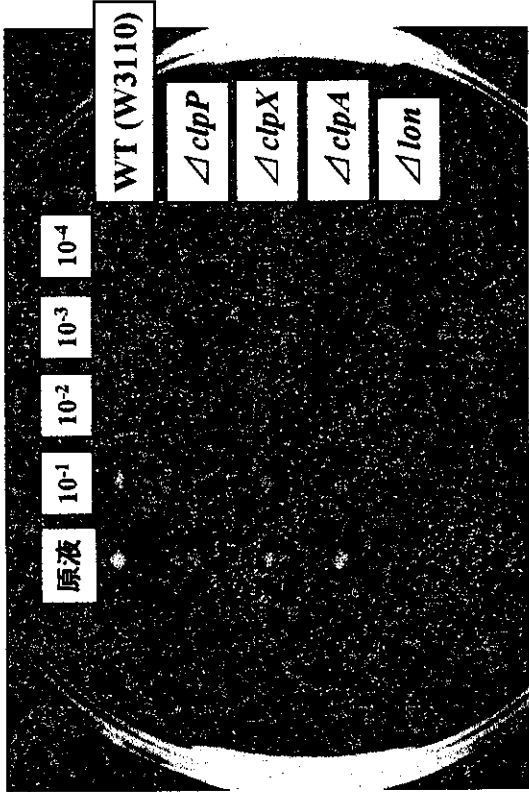
LVFX曝露後に誘導された蛋白は○で、消失・減少した蛋白は□で囲んだ。





Drug free

	原液	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
wild type	+++	+++	+++	++	+
ΔclpP	+++	+++	+++	+	+
ΔclpX	+++	+++	+++	++	+
ΔclpA	+++	+++	+++	++	+
Δlon	+++	+++	++	+	-



LVFX 0.0063 μg/mL

	原液	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Wild type	+++	+++	+++	++	+
ΔclpP	+++	+++	++	+	+
ΔclpX	+++	+++	++	+	+
ΔclpA	+++	+++	++	+	+
Δlon	-	-	-	-	-

図5 各種ストレス応答プロテアーゼ欠損によるLVFXに対する感受性の変化

# グリコペプチド耐性黄色ブドウ球菌の検出法と耐性遺伝子検査技術の開発

## —テイコプラニン感受性に影響を与える因子の解析—

分担研究者 和田昭仁 国立感染症研究所 細菌部

黄色ブドウ球菌のグリコペプチド耐性、特にテイコプラニンに耐性を与える遺伝子として、*tcaRAB* オペロンを同定し、COL 株においてこのオペロン変異が薬剤耐性に与える影響を相補実験にて解析し、以下の結果を得た。COL の *tcaRAB* 欠損株 (Etest 値 12 µg/ml) に対して *tcaR*, *tcaRAB*, *tcaAB*, *tcaA*, *tcaB* を各々相補したところ、*tcaR* を除く相補株で感受性の亢進が見られた (*tcaRAB*, 2 µg/ml; *tcaAB*, 2 µg/ml; *tcaA*, 2 µg/ml; *tcaB*, 3 µg/ml)。また、*TcaRAB*、*TcaAB* の過剰発現株では Etest 値はともに 1.5 µg/ml とコントロールプラスミドを持つ株の Etest 値 4 µg/ml よりも感受性の亢進が見られた。*TcaB* は疎水性アミノ酸を多く含み、膜に存在し薬剤進入または排泄に係っている可能性が考えられたが、*tcaRAB* 欠損株でクロラムフェニコール、オフロキサシンの感受性の変化は見られなかった。

### A. 研究目的

黄色ブドウ球菌は市中、院内感染の主要な起炎菌であり、なかでもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、医療上深刻な問題をもたらしてきた。1997 年に、バンコマイシン低感受性 MRSA の分離症例が初めて報告され、今後、このような菌の分離症例が増えることが懸念される。しかし、バンコマイシンの MIC 4 mg/L を示す菌は、その耐性度が不安定であり、hetero VRSA として提唱されている菌も、いまだその遺伝的背景は明らかでない。本研究では、黄色ブドウ球菌にグリコペプチド耐性をもたらす因子を遺伝学的に解析する目的で、薬剤としてテイコプラニンを用いている。これは、黄色ブドウ球菌はテイコプラニンに対してバンコマイシンより高度耐性化しやすく、*in vitro* での耐性菌の分離が簡単なためである。また、対象とする菌は臨床分離株ではなく、最近、オクラホマ大学において全ゲノム配列が決定された NCTC8325 株、並びにこの株と同じ

restriction 系を有する COL 株からの耐性菌変異株を用いている。この菌、並びにこの菌由来株で形質転換、形質導入が可能なことと、ゲノム配列に基づくさまざまな情報が利用できるからである。昨年の研究では、COL 株からトランスポゾン挿入株ライブラリーを作成し、この中からテイコプラニンに対して感受性が低下している菌 (MIC 12 µg/ml) を分離し、この菌において、破壊されている遺伝子を *tcaA* と名づけた。また、同時に分離した別のテイコプラニン低感受性株 BB1372 株 (MIC 12 µg/ml) においては、*tcaA* とともにこの遺伝子上流と下流の遺伝子を含む部分、*tcaRAB* が欠損していることを見つけたが、*tcaRAB* はオペロンをなしていたため、*tcaR*、*tcaA*、*tcaB* のどの遺伝子の欠損がテイコプラニン感受性に最も影響を与えるかを明らかにする必要がある。本年は、COL 株から *tcaR*、*tcaRA*、*tcaRAB*、*tcaA*、*tcaB* の各々を含む断片をクローニングし、*tcaRAB* 欠損株において、相補実験を行った。

## B. 方法

### *tca* 遺伝子のクローニング

各々の orf を含む領域を Expand High-Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) により増幅、これを、アミノ配糖体耐性遺伝子マーカー *aac-aph* をもつシャトルベクター、pAW17 にクローニングした。各々のプラスミドが持つ領域を Fig.1 に示す。各プラスミドが持つ配列を DNA オートシーケンサーにより確認し、PCR 増幅時のエラーによる変異がないクローンを相補実験に用いた。また、*ptcaB* は、*ptcaAB* のうち *tcaA* に含まれる *ClaI*-*ClaI* DNA 断片を除いて作成した。

### 黄色ブドウ球菌の形質転換

通常、restriction プラスの菌に対しては、restriction マイナス、modification プラスの菌である RN4220 を形質転換して得た株から調整した、phage80 $\alpha$  をもちいた形質導入をおこなう。しかし、本実験では、上記の各段階で起こりうる変異を避ける目的で、restriction プラスの菌を、エレクトロポレーション法で、直接、形質転換した。形質転換効率は  $1 \times 10^0$  から  $1 \times 10^1$  cfu/ $\mu$ g DNA である。

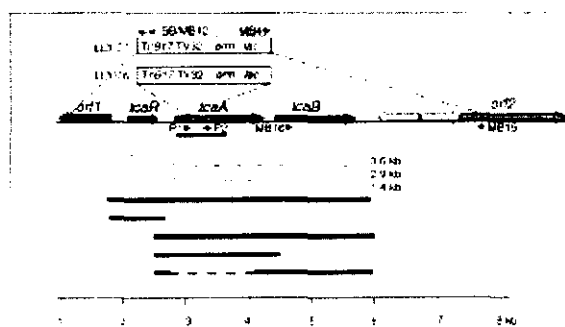
### グラジエントプレート作成

BHI (Difco) を基礎培地とし、Fig.2 に示したテイコプラニンの濃度勾配をもったグラジエントプレートを作成した。このプレートの中には、各菌のプラスミドを保持させる目的で 50  $\mu$ g/ml のカナマイシンを均一に含ませている。植菌量を一定にするために、McFarland 0.5 号の菌液を 2  $\mu$ l ずつスポットしていった。培養は 37C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 18 時間行った。

### 感受性測定

Mueller Hinton を用いて得られる MIC 値ではなく、BHI により得た Etest 値を測定した。培養条件はグラジエントプレートに対するものと同じものを用いた。

Fig. 1

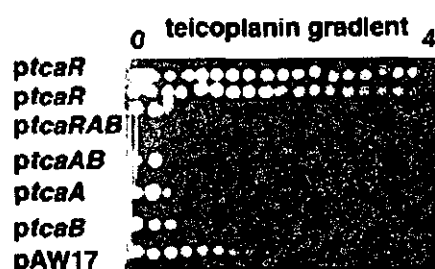


## C. 結果

*tcaRAB* 欠損株に *tcaRAB* の各 orf を相補した株のグラジエントプレート解析の結果を Fig.2 に示す。

Fig.2

### BB1372 (COL $\Delta$ *tcaRAB*::Tn917)



この結果から *tcaA* または *tcaB* だけでテイコプラニンに対する感受性を下げることができる結論することができる。また、*tcaR* だけを相補した株 (上 2 株、再上段は COL 由来 *tcaR*、その下は NCTC8325 由来 *tcaR*) ではコントロールプラスミド pAW17 を保有する株よりも、より高い濃度で生育することができたが Etest 値の差として捕まえることはできなかった (下参照)。

次に、Etest 値の測定結果 ( $\mu$ g/ml) を Table 1 に示す。

**Table 1**

	teicoplanin	vancomycin
BB1372		
( <i>ptcaRAB</i> )	2	3
( <i>ptcaR</i> )	12	3
( <i>ptcaAB</i> )	2	3
( <i>ptcaA</i> )	2	3
( <i>ptcaB</i> )	3	3
(pAW17)	12	4

この結果より、*tcaRAB* オペロンのうちテイコプラニン耐性に最も影響を与えるのは *tcaA* であるが *tcaB* 単独でも耐性の回復が見られ、また *tcaR* はこの条件では耐性に影響を与えないことが判明した。また、バンコマイシンに対する影響を Etest 値の差として捕まえることはできなかった。

最後に、COL 株に *TcaRAB* を過剰発現させた条件でテイコプラニンに対する Etest 値 ( $\mu\text{g/ml}$ ) がどのように変化するかを調べた (Table 2)。

**Table 2**

	teicoplanin	vancomycin
COL		
( <i>ptcaRAB</i> )	1.5	3
( <i>ptcaAB</i> )	1.5	3
(pAW17)	4	3

*tcaAB* の過剰発現により、コントロール株 COL (pAW17) よりもテイコプラニンに対する感受性が亢進した。

#### D. 考察

今回行った相補実験により、*tcaA* または *tcaB* によってテイコプラニンの感受性が亢進することがわかった。*TcaA* は N 末端から 1/3 の領域に強い疎水性部分を持ち、また *TcaB* は疎水性アミノ酸が豊富で、ともに膜蛋白である可能性が大きい。*TcaB* は *Salmonella* の bicyclomycin 耐性蛋白と 49% の相同性が認められるが、bicyclomycin はテイコプラニンと構造が異なる。*tcaRAB* 欠損株でクロラムフェニコール、オフロキサシンの Etest 値を野生株と

比較したが、これらに変化はなかった。テイコプラニンは主として細胞外で働く細胞壁合成阻害剤であると考えられているが、膜蛋白である可能性が高い *TcaB* の変異によりテイコプラニンの感受性が低下することを考えると、テイコプラニンは、細胞内で、ムレインモノマー、もしくはその前駆体に結合し、その合成ならびに膜外への translocation を阻害している可能性も考えられる。今後、抗 *TcaA* 抗体、もし可能であれば抗 *TcaB* 抗体作成し、テイコプラニンの作用機序を明らかにし、バンコマイシンのそれとどのように異なるかの検討を行う予定である。

#### E. 発表論文

なし。

無芽胞嫌気性グラム陰性桿菌の抗菌薬耐性化とその耐性機構  
第二報 *Fusobacterium* の抗菌薬感受性の現況と耐性菌検出法

分担研究者 渡邊邦友 (岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設)  
研究協力者 田中香お里 (岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設)

研究要旨

1995年から5年間に各種臨床材料から分離した *Fusobacterium nucleatum* 110株の薬剤感受性を微量液体希釈法希釈法で測定したところ、47株は測定不能であり、測定法に問題があった。そこで、*F. nucleatum*の50株を用いて、ampicillin(ABPC), piperacillin(PIPC), sulbactam/ piperacillin(SBT/PIPC), cefaclor(CCL), ceftiofuran(CFX), cefotaxime(CTX), erythromycin(EM), clindamycin(CLDM), tetracycline(TC), ofloxacin(OFLX)の10薬剤に対する感受性を寒天希釈法と寒天拡散法(Eテスト)で測定し、正確な感受性値を求めた。寒天平板希釈法とEテストでの測定結果は異なった。*F. nucleatum*は、ペニシリン系3薬剤には寒天希釈法では10%, セフェム系3薬剤には6~10%, OFLXには4%に耐性株が認められ、Eテストでは、それぞれ22~49%, 18~26%, 20%に耐性株が認められた。CLDMとTCにはいずれの方法でも耐性株は認められなかった。標準法である寒天希釈法での成績をみると、ペニシリン、セフェム系6薬剤に高度耐性を示す株が3株、中等度耐性を示す株が3株、そして、OFLXに中等度耐性を示す株が2株認められた。また、Eテストは、微量液体希釈法にかわる日常検査で実施可能な感受性試験であるが、その成績が寒天希釈法の成績と乖離することがあるので、判定方法の検討、調整が必要であると考えられた。

A. 研究目的

欧米では、 $\beta$ -lactamase 産生の *F. nucleatum* についての報告が見られ、そのような菌株が関係する治療の失敗例についての報告がある。しかし、*F. nucleatum* の薬剤感受性に関する信頼できる報告は、わが国ではほとんどみることができない。前回の研究で、本邦のある第二次医療施設での *Fusobacterium* が関与する感染症の実態を明らかにすることができた。微量液体希釈法による MIC 測定が同時に実施されたが、その薬剤感受性の測定は *F. nucleatum*

に対しては、満足できるものではないことも明らかとなった。そこで、著者らは、*F. nucleatum* の薬剤感受性を、基準法である寒天平板希釈法および微量液体希釈法の代替法としての寒天拡散法(Eテスト)で測定した。

B. 研究方法

使用菌株; 1995年から5年間に青森県立病院を受診あるいは入院して治療を受けた感染症患者から分離した *F. nucleatum* の50株を使用した。

感受性測定法；寒天平板法、寒天拡散法の2法を用いた。寒天平板法は、Brucella HK 血液寒天培地を基礎培地として、接種菌量は 105 cfu/spot で、48 時間の嫌気培養後に判定した。寒天拡散法は、E テストを用いて、供給者の指示書に従って実施した。

薬剤；ampicillin (ABPC), piperacillin (PIPC), sulbactam/piperacillin (SBT/PIPC), cefaclor (CCL), cefoxitin (CFX), cefotaxime (CTX), erythromycin (EM), clindamycin (CLDM), tetracycline (TC), ofloxacin (OFLX)の10薬剤を用いた。

### C. 成績

表1に、*F. nucleatum* 50株の寒天平板希釈法での成績をまとめた。NCCLSの提唱している感受性のブレイクポイント(BP)での感受性率とMIC rangeを示した。ペニシリン系3薬剤では90%、セフェム系3薬剤では90~94%、OFLXでは96%の感受性率であった。EMの感受性率は0%であり、TC、CLDMの耐性率は100%であった。また、表3に、 $\beta$ -lactamaseに高度耐性を示した3株の10薬剤に関するMICの実測値をまとめた。3株は、ペニシリン系、セフェム系薬剤の6薬剤に対して、一つの例外を除き、128  $\mu$ g/ml以上のMICを示した。EMには、8  $\mu$ g/ml以上で、CLDM、TCには、0.06~0.125  $\mu$ g/ml、OFLXには2  $\mu$ g/mlのMICを示した。また、 $\beta$ -ラクタムに中等度耐性示す別の3株も存在した。

表3に、同じく50株の寒天拡散法による成績をまとめた。NCCLSの提唱している感受性のブレイクポイント(BP)での感受性率とMIC rangeを示した。ペニシリン系3薬

剤では51~78%、セフェム系3薬剤では74~82%、OFLXでは80%の感受性率であった。EMの感受性率は2%であり、TC、CLDMの耐性率は100%であった。表4に測定法により成績が異なったOFLXの*F. nucleatum*6株に対するMICを示した。

### D. 考察

化学療法学会の標準法に合致するNCCLS法による寒天希釈法で測定した*F. nucleatum*の10薬剤に対する感受性試験結果から、*F. nucleatum*50株に $\beta$ -ラクタムに中等度以上の耐性を示す株が6株(12%)、高度耐性を示す株が3株(6%)存在することが明らかとなった。これらの株の $\beta$ -ラクタムに対する耐性機構については、今後の検討課題であるが、欧米では、 $\beta$ -ラクタマーゼ産生の*F. nucleatum*が比較的高頻度に報告されている。今回著者らが分離したこれらの株は、ニトロセフィンディスクを用いる $\beta$ -ラクタマーゼ試験で陰性であったこと、また、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬のスルバクタムの添加によってもABPCのMICが影響を受けていないことから、 $\beta$ -ラクタマーゼによらない耐性であることが強く示唆された。欧米と日本における $\beta$ -ラクタム耐性株の耐性機構に異なる点があることが明らかとなった。その原因の一つとして、双方の抗菌薬の使用方法がことなる点が考えられるが、明らかではない。

また、寒天拡散法でのMICは、寒天希釈法でのMICより耐性側に判定される傾向を示していた。この傾向は、 $\beta$ -ラクタムとOFLXで顕著に観察された。特に、OFLXでは、寒天希釈法でMICが2  $\mu$ g/ml~8  $\mu$ g/mlであった6株では、寒天拡散法では、

32  $\mu$ g/ml あるいはそれ以上と 4 管耐性側への MIC のシフトが観察された。これらの 6 株は、寒天希釈法での MIC8  $\mu$ g/ml の 1 株を除いて、すべて、寒天拡散法で 2 重の発育阻止帯を示していた。二重阻止帯を呈した場合の判定法を、供給者の推奨する基準に従うと、寒天希釈法での値よりやや耐性側に判定されるという事実には注意する必要がある。

#### E. 結論

1995 年から 5 年間に一つの第二次医療施設で感染症患者から分離した株を用いて、わが国における *F. nucleatum* の  $\beta$ -ラクタム耐性、ニューキノロン耐性の存在の実

態とその頻度を明らかにした。わが国で分離された *F. nucleatum* の  $\beta$ -ラクタム耐性株の耐性機構は、欧米で報告されていた  $\beta$ -ラクタマーゼによるものとは異なり、その他の機構によるものと考えられた。

#### F. 健康危険情報:なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1)川村千鶴子、中村敏彦、貝森光大、渡邊邦友：5 年間で経験した *Fusobacterium* が関与する感染症 108 例の臨床細菌学的解析 感染症誌 76(1):23-31, 2002

表 1 寒天平板希釈法による *F. nucleatum* 50 株の代表的抗菌薬に対する感受性

薬剤	Break Point( $\mu$ g/ml)	MIC range ( $\mu$ g/ml)	感受性率 (%)
ABPC	2	$\leq 0.015 \sim > 128$	90
SBT/ABPC	8	$\leq 0.015 \sim > 128$	90
PIPC	32	$\leq 0.015 \sim > 128$	90
CCL	8	0.0125 $\sim > 128$	94
CTX	16	0.03 $\sim > 128$	94
CFX	16	0.0125 $\sim > 128$	90
TC	4	0.03 $\sim 1$	100
CLDM	2	0.03 $\sim 0.25$	100
EM	0.5	2 $\sim > 128$	0
OFLX	2	1 $\sim 8$	96

表 2 各種  $\beta$ -ラクタムの  $\beta$ -ラクタム耐性の *F. nucleatum* 6 株に対する MIC( $\mu$ g/ml)

	ABPC	PIPC	SBT/ABPC	CCL	CFX	CTX
FN16-43	>128*	>128	>128	>128	>128	>128
FN13-46	>128	>128	>128	>128	>128	>128
FN36-6	16	>128	>128	>128	>128	>128
FN27	32	128	128	32	64	1
FN7-20	32	>128	16	4	32	2

FN21-36-2	16	>128	16	4	32	4
-----------	----	------	----	---	----	---

表3 寒天拡散法（Eテスト）による *F. nucleatum* 50株の代表的抗菌薬に対する感受性

薬剤	Break Point( $\mu$ g/ml)	MIC range( $\mu$ g/ml)	感受性率(%)
ABPC	2	0.016~>256	74
SBT/ABPC	8	$\leq$ 0.016~>256	78
PIPC	32	$\leq$ 0.016~>256	51
CCL	8	0.032~>256	82
CTX	16	0.012~>256	76
CFX	16	0.047~>256	74
TC	4	0.013~0.75	100
CLDM	2	$\leq$ 0.016~0.64	100
EM	0.5	0.19~>256	2
OFLX	2	0.5~>32	80

表4 寒天希釈法と寒天拡散法による OFLX の *F. nucleatum* 6株に対する MIC の比較

	FN29-46	FN7-20	FN23-16-2	FN23-35	FN24-41-2	FN-20-13
寒天希釈法	4	2	2	2	2	8
Eテスト	>32	8	>32	>32	>32	>32

\* MIC:  $\mu$ g/ml



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

タイ国の養鶏環境及び鶏肉のバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)とタイ国における VRE 制御対策

主任研究者 池 康嘉（群馬大学医学部微生物学教室）

研究協力者 谷本弘一<sup>1</sup>、藤本修平<sup>1</sup>、富田治芳<sup>1</sup>、野村隆浩<sup>1</sup>、Kanarat Sasitorn<sup>1</sup>

（群馬大学医学部微生物学教室<sup>1</sup>、タイ国農業省Dept. of Livestock Development<sup>1</sup>）

**研究要旨** 我が国はいわゆる先進国の中では唯一、臨床現場に VRE が広がっていない国であり、現在までに 20~30 例の報告がある。しかしながら、家畜でアポパルシンの使用歴のあるタイやフランスからの輸入鶏肉から、高頻度(20~50%)に VRE が検出される。特にタイ産鶏肉は多く輸入されており、鶏肉を介しての VRE の人への伝播が懸念される。輸入食品を介しての人への VRE の伝播を制御する目的で、タイ国立食品衛生局との共同で、タイ国養鶏環境における VRE 実態調査と VRE 制御対策を行った。タイ養鶏会社 20 社に属する Breeder farm、Hatchery、Broiler farm、Chicken meat、Chicken cloacal swab それぞれのサンプルの VRE を調べた。Breeder farm:35 farms の 35 samples (1 sample は 1 breeder farm の 60 ヶ所から鶏糞便をそれぞれ 1 gram、合計 60 gram を採集したもの) Hatchery:86 hatchery から 86 samples (1 sample は 1 hatchery の tray の swab) Broiler farm 300 養鶏場の糞便を 300 samples(1sample は 1 養鶏場の 60 カ所から、鶏糞便をそれぞれ 1 gram、合計 60 g を採取したもの)、輸出用 Chicken meat 530 samples(1 sample は約 300 gram の鶏肉を細かく切断し、そのうち 25 g を 1 sample として使用)、Chicken cloacal swab(1 sample は 1 農場 60 羽の、それぞれの鶏腸管糞便の swab を採取したもの)300 samples を調べた。その結果、サンプル当たり VRE の分離頻度は Breeder farm から 12%、Hatchery から 28%、Broiler farm から 14%、Chicken meat から 16%、Cloacal swab から 25%の頻度で VanA 型 VRE が分離された。その後、出荷後、床の敷藁交換の徹底、床の清掃及びグルテアルデヒド塩素系消毒薬で消毒を行った。その後、半年後の調査で、それぞれの sample からの VRE 分離率は 1%、4.6%、5%、1.3%、3%と減少していた。この研究で分離された VRE は全て VanA 型 VRE で、前に報告した日本のタイからの輸入鶏肉の VanA 型 VRE で発見される、VanS 遺伝子に 3 箇所の変異のあ

る新型の VRE であった。

## A. 目的

バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)は、1988年に英国とフランスでそれぞれ最初に報告された。以来欧米において医療環境、自然環境に広がっている。最近ではアジアの韓国、中国、台湾、タイ等においても一般的に分離されるようになってきている。特にアメリカ合衆国においては VRE の最初の報告以来予期せぬ速さで VRE が医療環境に広がり、易感染者における敗血症等の重症院内感染症原因となり、その感染症治療及び医療経済的負担に大きな問題となっている。現在米国においては大学病院規模の一病院当り年間 300～400 例の VRE が分離されている。米国で医療界に VRE が広がったのは、医療界でのバンコマイシンの多用が原因とされている。EU 各国ではグリコペプチド系の抗生物質のアポパルシンを長年家畜、特に養鶏において成長促進の目的で使用したために養鶏環境で VRE が広がり、それが自然環境あるいは健常者に伝播していったとされる。我が国は、いわゆる先進国の中では唯一、医療現場に VRE が広がっていない国であり、現在までに 20～30 例の報告がある。しかしながら家畜でアポパルシンの使用歴のあるタイやフランスからの輸入鶏肉から、高頻度(20～50%)に VRE が検出される。我が国は年間約 600,000 トンの鶏肉を輸入し、そのうち約 100,000 トン(16.6%)はタイから輸入されている。国内の鶏肉生産量は 1,200,000 トンである。このこ

とは、輸入鶏肉を介しての VRE の人への伝播が懸念される。この研究では、人への VRE の伝播を制御する目的で、タイ国における養鶏環境及びタイの輸出用鶏肉における VRE の実態調査と VRE 制御対策をタイ国立食品衛生局との共同で行った。

## B. 材料及び方法

### 調査期間及び調査施設

調査期間、2001年2月～9月

調査施設、タイ国内養鶏会社 20 社の Breeder farm、Broiler farm、Hatchery、Slaughter house、Processing plant 及び関連の Duck farm の VRE 調査を行った。また市販の鶏肉、豚肉の VRE 調査を行った。

### サンプル採取

Breeder farm、Broiler farm よりのサンプル採集；feces、各会社傘下の Breeder farms から 35 farms、Broiler farms から 5 farms (100 farms、321 samples) のサンプルを採取。(1 farm から 1 鶏舎が選ばれサンプルを採取。)

Hatchery よりのサンプル採集；孵卵器内の卵を置くトレイの swab (89 hatceries)

Slaughter house よりのサンプル採集；Cloacal swab、Chicken meat は 5 farms (5 鶏舎) 分が検査対象(296 samples)。Chicken meat は Slaughter house あたり 5 検体(532 samples)

それぞれのサンプルからの VRE の選択培養

VRE 分離のためサンプルからの増菌は英国 Oxoid社に作らせた VRE 選択用液体培地(Bile Escaline Azide agar から寒天を除いたものに相当) を用いた。VRE 選択には VRE 選択用液体培地、又は Bile Escaline Azide agar 培地にバンコマイシン 12.5 µg/ml を加え用いた。

feces の選択培養；鶏舎内の 60 ケ所から 1 ケ所当り 1g の糞を採取し、合計 60g をよく混ぜた後 25g を取り、225ml の VRE 選択培地に加え培養する。

chicken meat の選択培養；肉片 2-3 片（合計約 300 g を採取し、うち 25 g を取り、225ml の VRE 選択培地に加え培養する。

cloacal swab の選択培養；slaughter house に搬入された殺す前の鶏について、1 farm 当り（1 鶏舎由来の）60 羽について cloacal swab を取る。集まった 60 個の swab の先端を 1 つの容器に集め、その swab が浸る程度の VRE 選択培地を加え培養する。

### 養鶏場の消毒

消毒薬：グルタルアルデヒド系薬剤

消毒対象：VRE がサンプルから検出された場合、そのサンプルが検出された環境を消毒する。鶏舎の場合、会社に対しては鶏を出荷して鶏舎が空になる度に消毒するよう指示。

Broiler farm；鶏を出荷して空になった時に鶏舎の消毒を行う。給水・給餌用の配管を外す。配管については外で別個に消毒する。鶏舎は高圧水をかけて洗浄した後、ブラシ掛けを行う。2 日間かけて乾燥させ

た後、消毒液をスプレーしたりホルマリン燻蒸を行う。1-2 週間放置し十分消毒剤がなくなった頃、新しい床敷きを入れ新しい鶏を入れる。

Breeder farm；Broiler farm と同様にして消毒した新しい鶏舎に鶏を移動させる。（VRE positive のサンプルが出るようなことがなければ、卵を産まなくなって親鳥の入れ替えをするときに鶏舎の消毒を行う。）

Hatchery；卵を置くトレイを水洗いし、消毒剤をスプレーしたり消毒剤のしみこんだ布で拭く。新しい卵を孵化させる前に行う。

Slaughter house；日常的に消毒しているので衛生状態を良くするように更に注意を喚起している。別の試みとして、内臓を取り出した後の肉の内外をさらに高圧の水で洗うことを試みている Slaughter house もある。

## C. 結果

### VRE の検出率

それぞれのサンプル（検体）からの VRE が検出された検体件数を、表 1 及び図 1 に示す。VRE 制御対策を行う前のそれぞれの養鶏施設からの VRE 検出率は、14%~35%と高頻度に検出された。また鶏腸管内糞便と鶏肉からの VRE 検出率は、それぞれ 25%、15.4%であった。養鶏環境の清掃、消毒等の VRE 制御対策をそれぞれの養鶏施設で実施するようにした。その後の VRE の検出率は、Breeder farm、

Hatchery、Broiler farm でそれぞれ 2%、4.6%、2.5%で鶏腸管糞便、鶏肉からの分離率はそれぞれ 3%、1.3%であった。

#### バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の細菌学的性質

247 samples (表 1) より 758 株の VRE が分離された。1 sample から 1 株の VRE を選び、合計 247 株の VRE について解析した。

1) バンコマイシン耐性型。vanA、vanB、vanC 特異的プライマーを用いて PCR を行った。247 株のうち 244 株は VanA 型、2 株は VanA+VanC1 型、1 株は VanC2/3 型であった。

2) プラスミド DNA の EcoRI 断片のアガロースゲル電気泳動型。247 株の VRE から、それぞれプラスミド DNA を分離し、EcoRI で処理後 EcoRI 断片のアガロースゲル電気泳動を行った。それぞれの DNA の、EcoRI 断片アガロースゲル電気泳動の型から、247 株を含有プラスミドによって分類した。プラスミド型数は 89 型に分類された。複数の菌がそれぞれ同一の型のプラスミドを保持しているプラスミド型は、27 種類の型が存在した。27 種類の中で多くの株が保持している型と菌株数は、1 型は *E. faecalis* 11 株、4 型は *E. faecalis* 9 株、7 型は *E. faecium* 17 株、8 型は *E. faecalis* 88 株の菌がそれぞれ保持していた。89 種の型のうち、63 種類の型はそれぞれ異なる菌が保持していた。

3) 菌の DNA の SmaI 断片の Pulsed Field Gel Electrophoresis による解析。プラスミド型が 1 型、4 型、7 型、8 型を保持する菌について、それぞれ異なる養鶏環境から分離

された VRE それぞれの DNA を SmaI 処理後、PFGE を行った。PFGE 泳動型は、1 型は 5 株中 4 株、4 型は 4 株中 3 株、7 型は 5 株中 5 株、8 型は 5 株中 5 株がそれぞれ同一の泳動型を示した。

#### VRE の薬剤耐性と Van 遺伝子

鶏肉の異なる検体から分離された VanA 型 VRE から、それぞれ 1 株または 2 株を選び、それらの薬剤耐性を VanA 型遺伝子の vanS 遺伝子の DNA 塩基配列を調べた (表 2)。また、異なる 2 つの鶏舎 (Broiler farm) の鶏糞便から得られた、VanA 型 VRE の薬剤耐性と vanS 遺伝子の DNA 塩基配列を調べた (表 2)。薬剤耐性では、多くの株で高度バンコマイシン低度テイコプラニン耐性を示した。vanS 遺伝子の解析では、すべての株で野生型 VanA 遺伝子と比較して 3ヶ所にアミノ配の変異 (置換) が存在した。それらの変異は L50→V、E54→Q、Q69→H の変異であった。

#### D. 考 察

タイ国では輸出用鶏肉養鶏は主要な産業である。我が国では年間約 100,000 トン (輸入鶏肉当り 16.6%) をタイから輸入している。過去 4 年間、我が国で定期的に調査を行ってきた。その結果、過去にアボパルシンの使用歴のあるタイやフランスの鶏肉から、高頻度に (20~50%) に VRE が検出された。このことは、我が国において、輸入鶏肉を介して VRE が伝播する可能性を示唆している。今回の海外との調査研究では、タイ国からの輸入