

1,024 µg/ml の高度ゲンタマイシンのゲンタマイシン耐性を示した。液体培地中、固形培地上での接合伝達で、それぞれ供与菌あたり 10^{-5} ~ 10^{-6} 、 10^{-2} ~ 10^{-4} の高頻度で接合伝達した。

ゲンタマイシン耐性菌接合伝達性プラスミドの解析

261 株のゲンタマイシン耐性接合伝達性株から 60 株を選び、接合伝達性のプラスミド DNA を解析した。*E. faecium*BM4105SS 接合伝達性プラスミド DNA を分離し、*EcoRI* を切断片の agarose gel 電気泳動を行い、pMG1 との Southern hybridization (DNA 相補実験) を行った。

pMG1 と相補結合する *EcoRI* 断片の形から、60 株のプラスミドは 5 種類 (A~E) に分類された。そのうち A、B 型がそれぞれ 40% と最も多く分離された。その結果を図 2 に示す。

接合伝達性プラスミドの分離

A~E 型を保持している接合伝達株を用いて、*E. faecium*BM4105 株の間で接合伝達を繰り返し、それぞれの型のプラスミドを単離した。それぞれのプラスミドを *EcoRI* 及び *NdeI* で処理し、agarose gel 電気泳動をおこなったものと、それを用いて pMG1 と Southern hybridization を行った結果を図 3 に示す。それぞれの型のプラスミドが単離されていることが解る。また、pMG1 との相補実験で、それぞれのプラスミドの断片はすべて pMG1 と同一性があった。

ゲンタマイシンプラスミドの接合伝達

A~E 型プラスミドの腸球菌における接合伝達実験を行った (表 2)。それぞれのプラスミドは液体培地中、filter mating それぞれにおいて高頻度に接合伝達した。

ゲンタマイシンプラスミド保持菌のバンコマイシン耐性の伝達

ゲンタマイシン接合伝達株において、バンコマイシンの接合伝達性を調べた。261 株株のゲンタマイシン接合伝達株のうち、255 株 (97.7%) はバンコマイシン耐性が固形培地上で供与菌当り 10^{-5} ~ 10^{-6} の頻度で接合伝達をした。

492 株のゲンタマイシン耐性のうち、145 株がゲンタマイシン耐性を接合伝達しない株であった。この株及び 148 株のゲンタマイシン感受性株は、それぞれ 40 株 (48%) 及び 64 株 (43%) のバンコマイシン耐性か、固形培地上で接合伝達した。

D. 考 察

日本の臨床分離 *E. faecium* から、世界で初めて分離された *E. faecium* の高頻度接合伝達性プラスミドが、VRE を含む *E. faecium* 菌に一般的に存在するプラスミドであるか否かを調べた。

その結果、米国の VRE に pMG1 型プラスミドが高頻度に存在し、それらのプラスミドは液体培地中で高頻度に接合伝達することが解った。さらに、このプラスミド保持菌のほとんどすべては、バンコマイシン耐性も高頻度で接合伝達することが解った。これらの結果は、pMG1 型プラスミドが、日本のみな

らず世界的にも VRE を含む *E. faecium* 菌に一般に存在し、この菌において薬剤耐性を広げる重要な役割をしていることを示すものである。

E. 結論

VRE を含め、*E. faecium* 菌は多くのプラスミドを含んでいるが、これらのプラスミドの接合伝達性、機能等に関する報告はこれまでほとんど無かった。我が国で最初に分離された *E. faecium* 菌の接合伝達性プラスミド pMG1 と同様のプラスミド (pMG1 型プラスミド) が *E. faecium* 菌に一般に存在する重要なプラスミドであることが解った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究成果

1: Ozawa Y, Tanimoto K, Nomura T, Yoshinaga M, Arakawa Y, Ike Y.
Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan.
Appl Environ Microbiol.
2002;68(12):6457-61.

2: Tanimoto K, Ike Y.

Analysis of the conjugal transfer system of the pheromone-independent highly transferable *Enterococcus* plasmid pMG1: identification of a *tra* gene (traA) up-regulated during conjugation.
J Bacteriol. 2002;184(20):5800-4.

3: Tomita H, Pierson C, Lim SK, Clewell DB, Ike Y.

Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*.

J Clin Microbiol. 2002;40(9):3326-33.

4: Ike Y, Arakawa Y, Ma X, Tatewaki K, Nagasawa M, Tomita H, Tanimoto K, Fujimoto S.

Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals.
J Clin Microbiol. 2001;39(12):4445-51.

5: Francia MV, Haas W, Wirth R, Samberger E, Muscholl-Silberhorn A, Gilmore MS, Ike Y, Weaver KE, An FY, Clewell DB.

Completion of the nucleotide sequence of the *Enterococcus faecalis* conjugative virulence plasmid pAD1 and identification of a second transfer origin. *Plasmid.*
2001;46(2):117-27.

H. 知的所有権の取得状況

なし

表 1. Antimicrobial drug resistance pattern of vancomycin resistance *E. faecium* isolates

| Resistance pattern | No. of isolates (%) |
|--|---------------------|
| Apc Gen Kan Str Tei Van | 245 (38.3) |
| Apc Gen Kan Str Tet Tei Van | 97 (15.2) |
| Apc Gen Kan Tei Van | 81 (12.7) |
| Apc Kan Str Tei Van | 50 (7.8) |
| Apc Gen Kan Tet Tei Van | 34 (5.3) |
| Apc Kan Str Tet Tei Van | 18 (2.8) |
| Apc Tei Van | 17 (2.7) |
| Apc Kan Str Van | 14 (2.2) |
| Apc Gen Kan Str Van | 8 (1.3) |
| Apc Str Tet Tei Van | 6 (0.9) |
| Apc Gen Kan Van | 6 (0.9) |
| Other 30 different patterns ^a | 64 (10) |

Apc, ampicillin resistance; Gen, gentamicin resistance; Kan, kanamycin resistance; Str, streptomycin resistance; Tet, tetracycline resistance; Tei, teicoplanin resistance; Van, vancomycin resistance. Drug resistance level (MIC, µg/ml) of Apc, Gen, Kan, Str, Tet, Tei and Van was equal to or greater than 16, 64, 1024, 512, 8, 16, and 64, respectively. ^a No. of strain of each of 30 different patterns was less than six strains.

表 2. Transfer frequency of each type gentamicin resistance plasmid in *Enterococcus*.

| Type of Gm ^r plasmid | Donor | Recipient | Transfer frequency (no. of transconjugants per donor) | |
|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|---|----------------------|
| | | | broth mating | filter mating |
| A | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG200) | <i>E. faecium</i> BM4105SS | 8 x 10 ⁻⁵ | >1 |
| | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG200) | <i>E. faecalis</i> JH2SS | 1 x 10 ⁻⁷ | 8 x 10 ⁻⁴ |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG200) | <i>E. faecalis</i> FA2-2 | 3 x 10 ⁻⁷ | 3 x 10 ⁻³ |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG200) | <i>E. faecium</i> BM4105RF | 7 x 10 ⁻⁵ | >1 |
| B | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG247) | <i>E. faecium</i> BM4105SS | 1 x 10 ⁻³ | >1 |
| | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG247) | <i>E. faecalis</i> JH2SS | 3 x 10 ⁻⁶ | 3 x 10 ⁻² |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG247) | <i>E. faecalis</i> FA2-2 | 1 x 10 ⁻⁶ | 1 x 10 ⁻² |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG247) | <i>E. faecium</i> BM4105RF | 3 x 10 ⁻⁴ | >1 |
| B | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG445) | <i>E. faecium</i> BM4105SS | 2 x 10 ⁻³ | >1 |
| | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG445) | <i>E. faecalis</i> JH2SS | 3 x 10 ⁻⁶ | 2 x 10 ⁻² |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG445) | <i>E. faecalis</i> FA2-2 | 4 x 10 ⁻⁶ | 4 x 10 ⁻² |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG445) | <i>E. faecium</i> BM4105RF | 3 x 10 ⁻³ | >1 |
| C | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG566) | <i>E. faecium</i> BM4105SS | 4 x 10 ⁻⁵ | >1 |
| | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG566) | <i>E. faecalis</i> JH2SS | 1 x 10 ⁻⁷ | 8 x 10 ⁻⁴ |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG566) | <i>E. faecalis</i> FA2-2 | 3 x 10 ⁻⁷ | 4 x 10 ⁻³ |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG566) | <i>E. faecium</i> BM4105RF | 9 x 10 ⁻⁵ | >1 |
| D | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG700) | <i>E. faecium</i> BM4105SS | 5 x 10 ⁻⁵ | >1 |
| | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG700) | <i>E. faecalis</i> JH2SS | 2 x 10 ⁻⁷ | 2 x 10 ⁻³ |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG700) | <i>E. faecalis</i> FA2-2 | 2 x 10 ⁻⁷ | 1 x 10 ⁻³ |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG700) | <i>E. faecium</i> BM4105RF | 8 x 10 ⁻⁵ | >1 |
| E | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG120) | <i>E. faecium</i> BM4105SS | 7 x 10 ⁻⁵ | >1 |
| | <i>E. faecium</i> BM4105RF(pG120) | <i>E. faecalis</i> JH2SS | 1 x 10 ⁻⁷ | 1 x 10 ⁻³ |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG120) | <i>E. faecalis</i> FA2-2 | 1 x 10 ⁻⁷ | 2 x 10 ⁻³ |
| | <i>E. faecalis</i> JH2SS(pG120) | <i>E. faecium</i> BM4105RF | 2 x 10 ⁻⁵ | >1 |
| pMG1 | <i>E. faecium</i> BM4105SS(pMG1) | <i>E. faecium</i> BM4105RF | 6 x 10 ⁻⁴ * | >1 |
| | <i>E. faecium</i> BM4105SS(pMG1) | <i>E. faecalis</i> FA2-2 | 2 x 10 ⁻⁴ | 3 x 10 ⁻³ |
| | <i>E. faecalis</i> FA2-2(pMG1) | <i>E. faecalis</i> JH2SS | 5 x 10 ⁻⁴ | 2 x 10 ⁻² |
| | <i>E. faecalis</i> FA2-2(pMG1) | <i>E. faecium</i> BM4105SS | 4 x 10 ⁻⁵ | >1 |

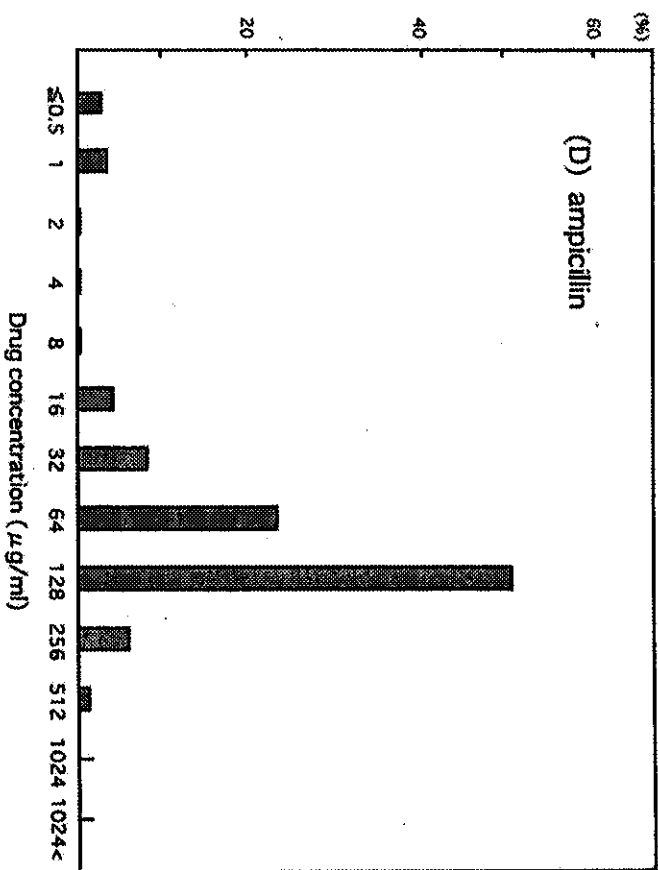
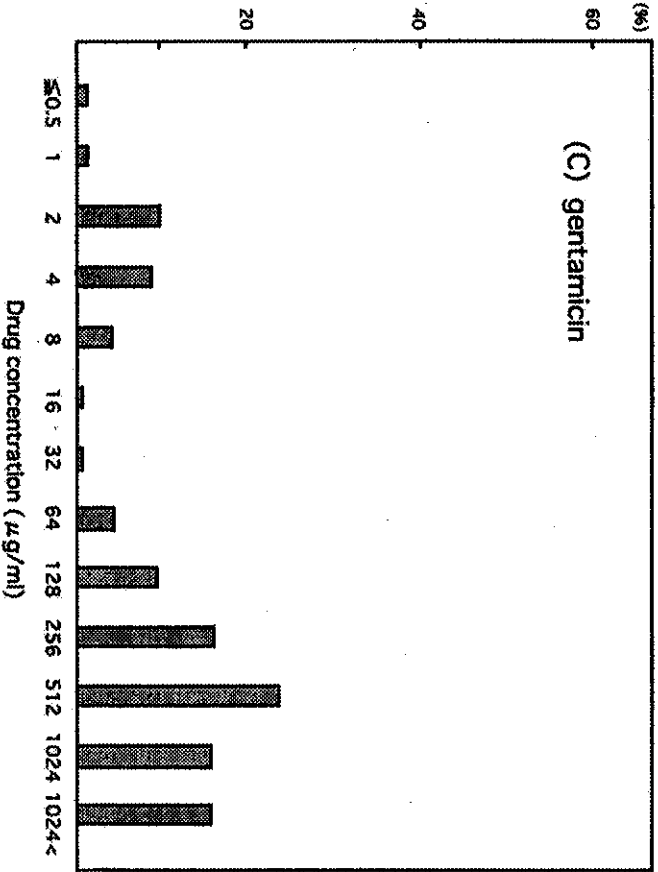
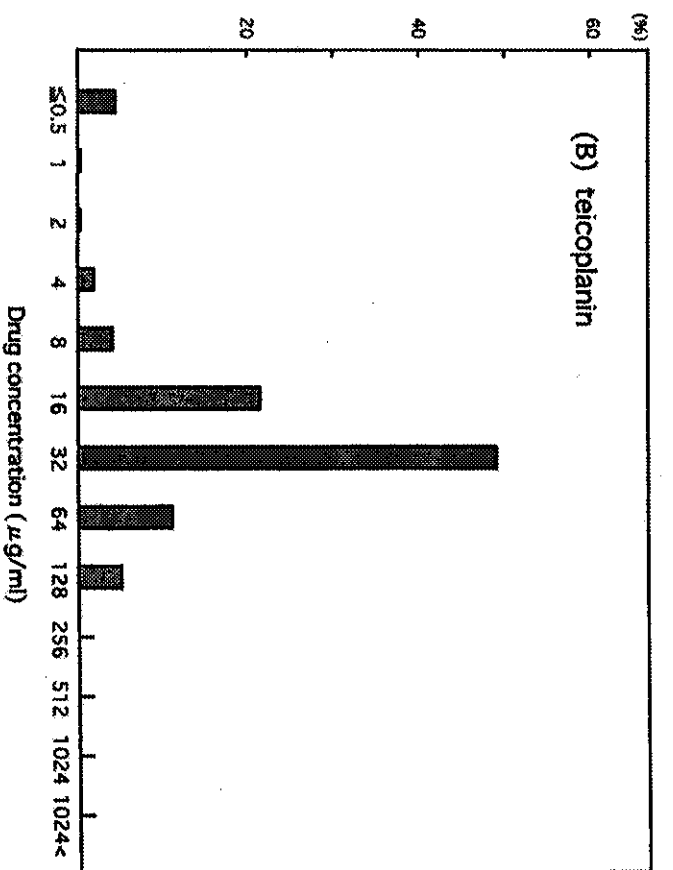
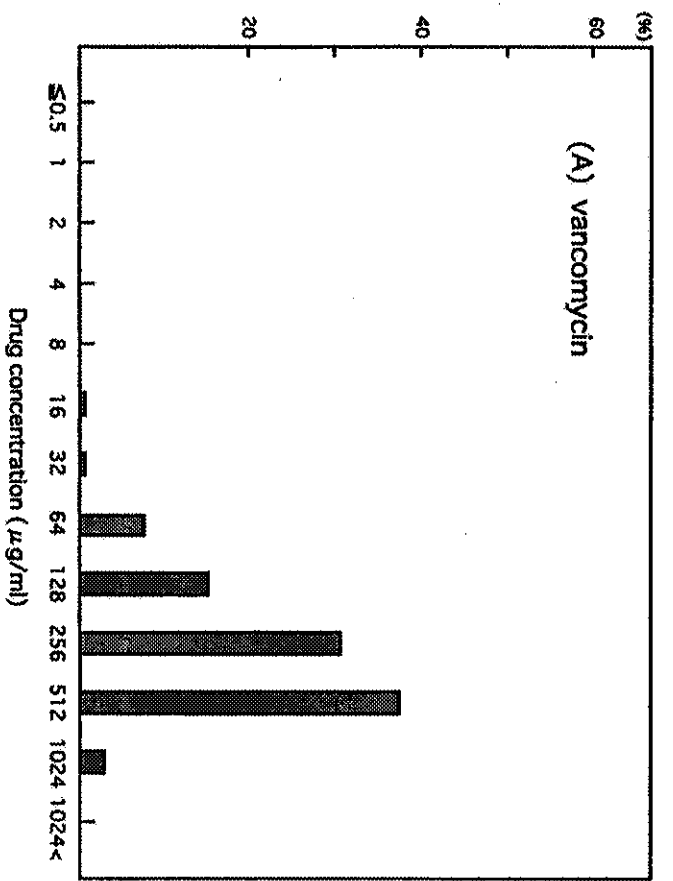


FIG. 1. Distribution of MICs of antimicrobials used in this study. The MIC of various antimicrobials (vancomycin [A], teicoplanin [B], gentamicin [C], and ampicillin [D]) for 640 isolates were examined by agar dilution methods as described in Materials and Methods.

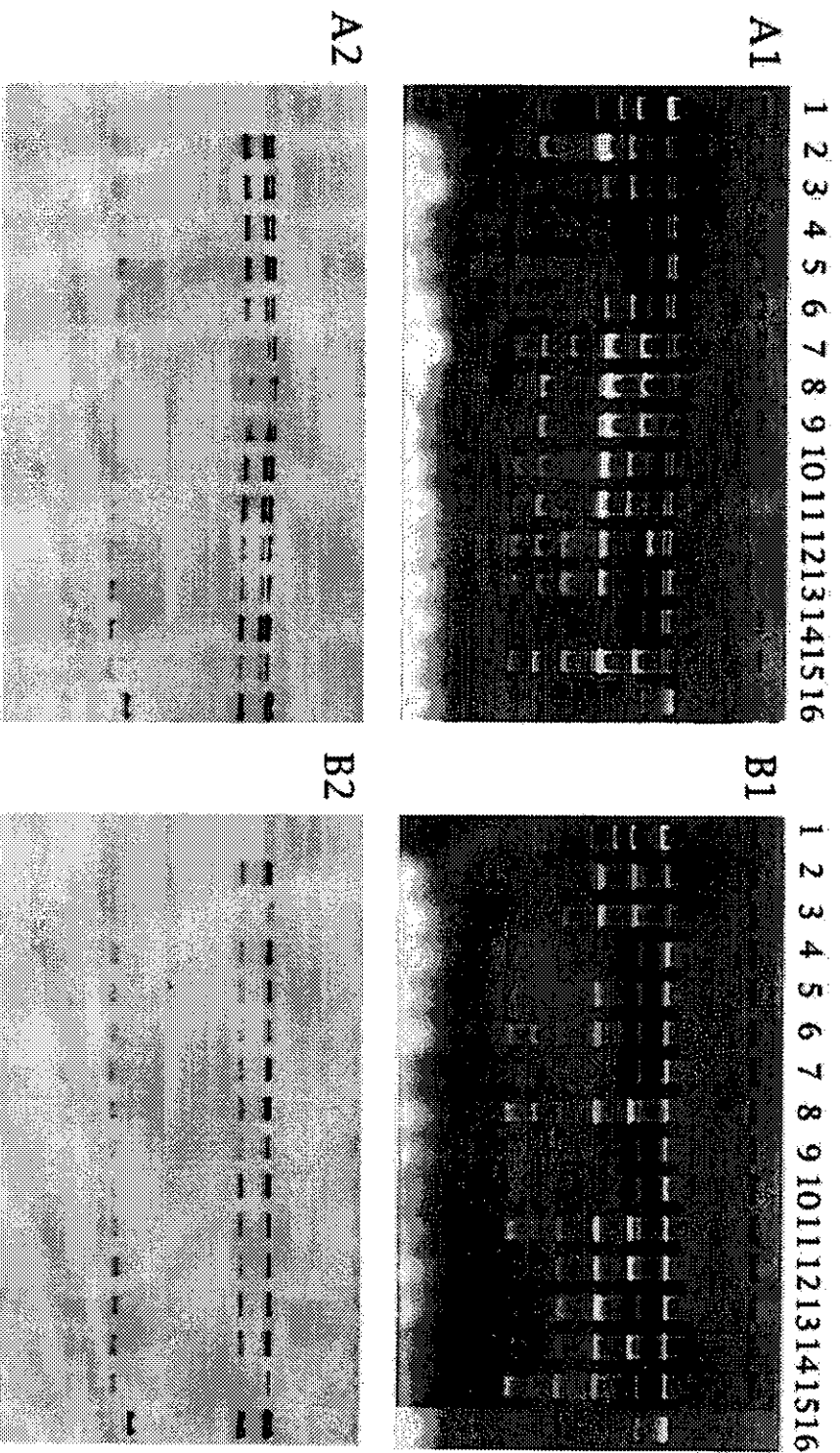
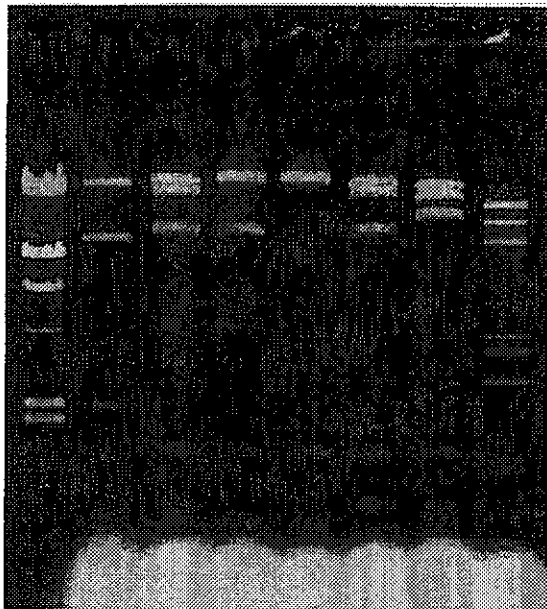


FIG. 2. Agarose gel electrophoresis of restriction endonuclease-digested plasmid DNAs and hybridization with plasmid pMG1. (A1) Agarose gel electrophoresis of *Eco*RI-digested plasmid DNAs isolated from gentamicin-resistant *E. faecium* BM41055S transconjugants harboring the type A gentamicin resistance conjugative plasmid. (A2) The gel was Southern blotted and hybridized to pMG1. (B1) Agarose gel electrophoresis of *Eco*RI-digested plasmid DNA isolated from gentamicin-resistant *E. faecium* BM41055S transconjugants harboring the type B gentamicin resistance conjugative plasmid. (B2) The gel was Southern blotted and hybridized to pMG1. (A) Lanes: 1, *Hind*III-digested lambda DNA; lanes 2 to 15, *Eco*RI-digested plasmid DNA isolated from transconjugants of strains 161, 200, 210, 253, 300, 306, 311, 317, 376, 469, 494, 537, 581, and 692, respectively; lane 16, *Eco*RI-digested pMG1. (B) Lanes: 1, *Hind*III-digested lambda DNA; lanes 2 to 14, *Eco*RI-digested plasmid DNA isolated from transconjugants of strains 70, 87, 133, 166, 205, 247, 282, 411, 445, 526, 587, 619, 666, and 725, respectively; lane 15, *Eco*RI-digested pMG1.

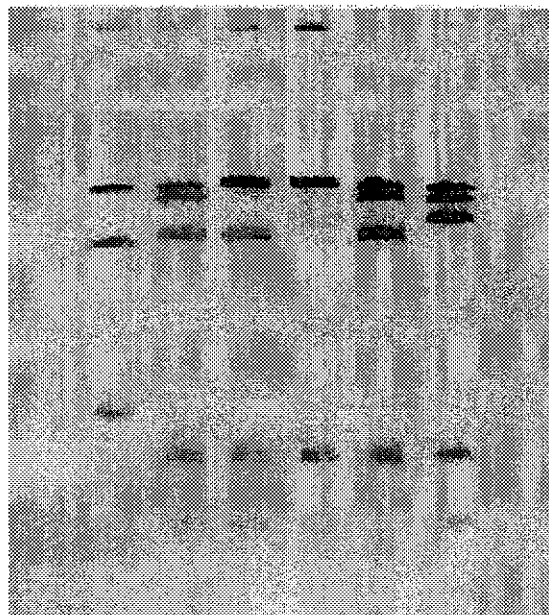
A1

1 2 3 4 5 6 7 8



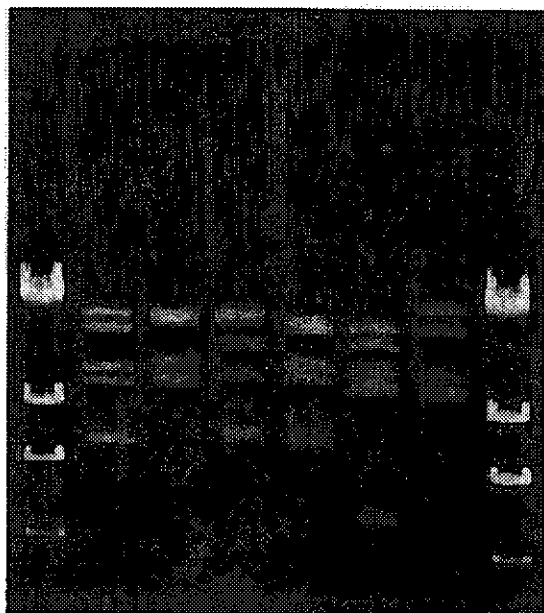
A2

1 2 3 4 5 6 7 8



B1

1 2 3 4 5 6 7 8



B2

1 2 3 4 5 6 7 8



FIG. 3. Agarose gel electrophoresis of restriction endonuclease-digested DNA of each type of gentamicin resistance conjugative plasmid and hybridization with pMG1. Agarose gel electrophoresis of *Eco*RI-digested plasmid DNA (A1) and the Southern hybridization with pMG1 (A2). Agarose gel electrophoresis of *Nde*I-digested plasmid DNA (B1) and Southern hybridization with pMG1 (B2). Lanes: 1, *Hind*III-digested lambda DNA; 2, pMG1; 3, pG200 (type A); 4, pG445 (type B); 5, pG566 (type C); 6, pG700 (type D); 7, pG120 (type E); 8, pAD1.

平成14年度 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

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

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 グラム陰性各菌種は染色体上に class C 型酵素の構造遺伝子 *ampC* とセファロスポリン系薬高度耐性化の主因酵素を調節している *ampD* と *ampR* について解析した。その結果、in vitro においてセフェム系薬耐性菌を選択すると、は先ず *ampD* 変異が優先すること、耐性菌に野生型 *ampD* を共存させることで変異型 *ampD* が確認できた。また、プラスミド化された *ampR-ampC* は、宿主の調節遺伝子 *ampD* 変異株でない限り耐性を発現し難く、*ampR* 変異は調節遺伝子 *ampD* 変異によって選択され易く安いことを明らかにした。臨床分離の *Enterobacter cloacae* 25 株について調べると、24 株が野生型 *ampD* 共存下で垂 AmpC 活性かつせいが著しく低下し、in vivo 耐性菌も in vitro の結果を反映していた。この実験系を用いることでセフェム系薬の耐性化の背景が迅速に診断できると考えられるに至った。

大病院とそこでの入院患者から分離される菌種は、グラム陽性菌では MRSA を含む *Staphylococcus aureus*, coagulase negative staphylococcus 属、腸球菌属、グラム陰性桿菌では *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* などが主たるものである。一方、外来患者や医院では、*S.aureus*, CNS, *Streptococcus pneumoniae*,

Hhaemophilus influenzae, *Branhamella catarrhalis*, *E.coli*, *K.pneumoniae* 及び *P.aeruginosa* が主体となる。これらの菌種に対して現在使用可能な抗菌薬は、経口薬及び注射薬を含めると 150 種類前後になるが、中でもペニシリン系薬、セファロスポリン系薬及びカルバペネム系薬などのβ-ラクタム薬が全体の 45% を占めている。中でもセファロスポリン系薬の種類の高さは、臨床現場でのβ-ラクタム系薬の使用量や使用頻度が多いことを示している。

一般にグラム陰性桿菌は、殆どの菌種が class C 型β-lactamase (セファロスポリナーゼ) の構造遺伝子 *ampC* を保有しているため抗菌薬の使い方次第では、耐性菌が選択される可能性が十分考えられる。

特にセファロスポリン系薬耐性菌が選択されることになる。事実、上記に挙げた菌種の中では、MRSA を除くと腸内細菌科の各菌種や *P.aeruginosa* からセファロスポリン系薬耐性菌が分離されている。構造遺伝子 *ampC* の産物 AmpC は、少なくとも 3 個の遺伝子とその産物によって調節される誘導型の酵素である。

そこで、当研究課題では、このセファロスポリン系薬高度耐性菌出現背景とその遺伝的要因を明らかにし、臨床分離セファロスポリン系薬高度耐性菌出現と抗菌薬との関係を明らかにし、その確認方法を確立させることにある。

グラム陰性桿菌のセファロスポリン系薬耐性菌とその遺伝子変異

(1) AmpD 遺伝子の関与について

E.coli K12 KU1 *ampD* に *E.cloacae* 由来の *ampR-ampC* をクローニングしたプラスミド pKU403 を形質転換させた菌株から CAZ 及び CET 種々の濃度を用いてそれぞれの耐性菌を分離した。その結果、CET では MIC の 64 倍、CAZ では MIC の 8~32 倍で耐性菌が 10^{-7} 頻度で分離され、その CET を基質とした時の素酵素の活性は、M-14, M3, M38, M130, M161 は野生株に比べ約 1000 倍、M7 及び M11 は約 70 倍上昇していた。また、*ampD* に IS5 と IS2 がそれぞれ挿入された変異株 M-8, M8 が分離された。そこで、これらの耐性菌から pKU403 を分離し、*E.coli* K-12 *ampD* 7(KU1) に形質転換させたところ、酵素活性は野生株と同程度と低かった。そこ

で、変異株 M-14, M3, M7, M11, M38, M130, M161 に *E. coli* K12 由来の野生型 *ampD*⁺ をクローン化した pKU420 を形質転換させた結果全ての宿主変異株での酵素活性が 0.1unit/mg protein 以下と著しく抑制され、同時にセファロスポリン系薬の MIC も低下した。そこで PCR 法によって *ampD* 遺伝子野生株及び変異株の塩基配列を調べた結果、M-14 は 14 ノアミノ酸 T が A, M3 は L3V、M7 は W7R M11 は W11G, M38 は L38Q M130 は Y130D M161 は R161L に変異しており、M-8, M85 はそれぞれの-8, 85 番目のアミノ酸部位に IS5, IS2 が挿入されていることが判った。以上 class C 型酵素産生菌は、先ず *ampD* 変異が優先的に生じ、それに伴って酵素活性も野生株の 70~1000 倍上昇し、セファロスポリン系薬に対する MIC も高度化することが判ったし。さらに、かかる野生型 *ampD*⁺ は *ampD* 変異株に対して優勢であることが判った。従って、臨床分離のセファロスポリン系薬耐性菌にプラスミド化した pKU420 を形質転換させることで容易に *ampD* 変異と特定できることが判った。

(2) 臨床分離 *Enterobacter cloacae* における class C 型酵素多量産生菌の遺伝子変異の特定

北里大学大学病院および数箇所病院で分離された CAZ に対する MIC が 1-4mg/L(2 株)、8-16mg/L(4 株)、32-64(5 株)及び>128(4 株)を得た。そこでこれらの各菌株から素酵素を抽出し、CET を基質とした時の class C 型酵素活性を調べたところ、順に 17unit/mg protein 1 株、約 10u/mg protein 前後 8 株、0.5u/mg protein 6 株であり、CAZ に対する MIC が 32mg/L は酵素活性が高い傾向にあった。次に、これらの野生株に *E. coli* K12 KU1 由来の *ampD*⁺ をクローン化したプラスミド pKU420 を形質転換させ、それぞれの class C 型酵素をテイアした。その結果、17unit/mg protein 1 株は 0.5u/mg protein, 約 10u/mg protein 前後 8 株は全てその活性が 0.01u/mg protein 以下となった。一方、0.5u/mg protein 6 株においては、その酵素活性は 0.001u/mg protein と元株の 1/500 以下と低下した。特に 17u/mg protein を産生した菌株は、PCR 法によって *toho-1* 型遺伝子が確認されたこと及び CET を基質としたことから、class C 型 10 から 5 unit/mg protein まで低下したと推定された。従って、これらの実験事実は、臨床分離 *E. cloacae* の CAZ 中等度耐性~高度耐性株は、25/26 が全て *ampD* 変異によって CAZ に対する MIC や class C 型酵素を多量によって産生していることが

明確となった。また、事実、これらの菌株の染色体 DNA の PFGE 型は、A 群 (5 株)、B、C 群 (各 3 株)、D 群 (2 株) であり、残りの株は異なる結果であったことから、臨床分離 *E. cloacae* のセファロスポリン系薬耐性化は薬剤による耐性菌の選択の可能性が強く示唆された。

(3) AmpG 欠損株でのセファロスポリン系薬耐性の発現と AmpC 活性

次に *E. coli* K12 株を宿主として pKU403 から AZT 及び CAZ 耐性菌を分離した結果、class C 型酵素活性に高い菌株を得た。かかる変異株からプラスミドを分離し、再度野生型 KU1 *ampD*⁺ と変異株 KU3 *ampD* に形質転換させたところ、3 株の酵素活性は pKU403 に比べて優位に高い活性を示したことから、変異株は pKU403 それ自身の変異であることが判った。DNA 塩基配列を調べた結果、3 株は *ampR* の 1 塩基変異であることが判り、これを pKU404, pKU405, pKU406 とした。そこで、*ampR* 変異プラスミドを用いて、*ampR* 変異と class C 型酵素産生との関係について調べた。宿主として *E. coli* K12 KU4182 *ampG*⁺ を受容菌として、pKU403 及びその *ampR* 変異株 pKU404, pKU405, pKU406 をそれぞれ形質転換させ、常法に従って CET を基質に class C 型酵素活性を測定した。その結果、KU4182 を宿主とした場合の pKU403 の酵素活性は KU1 のそれと同程度であった。しかし、*ampR* 変異 pKU404, pKU405, pKU406 の酵素活性は、明らかに KU1 及び KU4182 両宿主で同程度であり、その時の酵素活性は KU3 を宿主として誘導をかけた pKU403 のそれに匹敵するほど高かった。以上の実験結果から、*ampR* 変異 AmpD の影響を受けることなく class C 型酵素を活性化することが判った。次に *ampR* 変異と AmpG との関係調べた。KU4182 KU4183 を宿主として *ampR* 変異の酵素活性を調べた。その結果いずれの *ampR* 変異株の class C 型酵素活性は高く、KU1 や KU4182 を宿主とした場合とほぼ同程度に高かった。ことから、*ampR* 変異は AmpG 産物の有無に関らず class C 型酵素を産生することが判った。また、自然界から分離した class C 型酵素を全く産生しないセファロスポリン系薬感受性 *E. cloacae* にこの変異型 *ampR* DNA 断片を共存させると class C 型酵素活性が著しく増えることから *ampR* 野生株に対して *ampR* 変異が優性であることも判明した。以上の実験結果から、*ampR-ampC* を保有する場合、*ampR* が変異すると AmpC は *ampD*, *ampG* いずれの野生株でも十分量産生し、セファロスポリン系薬高度耐性に大きく関与する可能性とその選択条件が示唆されたものとする。

(4) *Enterobacter cloacae* 由来 class C 型 β -ラクタマーゼ産生に關与する調節遺伝子 *ampG* の解析

Class C 型 β -ラクタマーゼ AmpC 産生の初期段階に關与する AmpG については、その機能が詳しく調べられていない。そこで、今回は *ampG* 及びその産物である AmpG について調べ、セフェム系薬の耐性発現の調節機構を分子メカニズムの観点から解析した。

E. cloacae の *ampG* 全領域を含むプラスミド pGKS171-3 についてプライマーウオーキングを行い、*ampG* の DNA シークエンスを決定した。また、このプライマーをもとに、臨床分離株 KU3 及び、そのセフェム系薬超感受性変異株 KU69、さらに復帰変異株 10 株について DNA シークエンスを行った。また、 β -ラクタマーゼ及び AmpG に対するペプチド抗体を用いて各菌株をレーザー顕微鏡で観察し、さらに電子顕微鏡を用いて細菌内の AmpG 局在観察を行った。その結果、臨床分離株 KU3 (*E. cloacae*) を親株とし、セフェム系薬超感受性 KU69、及びその復帰変異株 60 株を選択し、これらの株の *ampG* の DNA シークエンスを行った。その結果、セファロスポリン系薬超感受性 KU69 の *ampG* は、親株 KU3 と比べ 132 番目のトリプトファン (TGG) が点変異によって終止コドン (TAG) となった。それに伴ない親株 KU3 の β -ラクタマーゼ活性に比べ約 1/3000 に低下することが判った。即ち、AmpG の機能を傷害させることが、 β -ラクタマーゼの耐性化を防ぐと一つの方法となり得る。

次に、 β -ラクタマーゼ抗体及び AmpG 抗体を用いて、細胞内での β -ラクタマーゼの有無をレーザー顕微鏡で観察した結果、KU3 では class C 型 β -ラクタマーゼの産生を認めたが、KU69 では β -ラクタマーゼとの反応は著しく抑制されるという結果を得た。AmpG 点変異株または欠損株では class C 型 β -ラクタマーゼが産生されないことが判った。

一方、KU69 の復帰変異株 60 株から class C 型酵素活性の異なるものを任意に 10 株選択し、*ampG* の DNA シークエンスを行った結果、KU69 と比べ 132 番目の終止コドン (TAG) がチロシン (TAT) に変異したもの 3 株、グルタミン (CAG) に変異したもの 1 株、リジン (AAG) に変異したもの 1 株得られた。この中には、 β -ラクタマーゼの酵素活性が親株 KU3 と同等に回復した変異株も認められた。このことから、132 番目以降のアミノ酸が AmpG 活性に影響を十分与え得るものと言える。今回の結果では、AmpG の量的変化が薬剤によって影響を

受けるのか、あるいは今のところ、*ampG*の活性部位は不明である。今後の課題と考える。

研究成果

1. Matsuoka, M., K. Endo, Y. Nakajima, T. Watanabe and M. Inoue. A new macrolide resistant gene *ermF* that encoded by plasmid in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** 46: 154-159, 2002.
2. Lee, K., J. K. Lim, D. Yong, J. Yum, Y. Chong, R. Okamoto and Inoue, M.. Evaluation of efficacy of screening extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* where bacteria are increasingly prevalent **J Clin Microbiol** 39: 3696-3699, 2001.
3. Xiong Z, Zhu D, Wang F, Zhan Y, Okamoto R and M. Inoue Investigation of extended spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Diag Microbiol Infect Dis** 44: 195-200, 2002
4. Ida, T., R. Okamoto, M. Nonoyama, K. Irinoda, M. Kurazono and M. Inoue. Antagonism Between aminoglycosides and β -lactams in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate involves induction of an aminoglycoside modifying enzyme. **Antimicrob Agents Chemother** 46: 1516-1522, 2002

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 北里大学北里生命科学研究所

〔研究要旨〕急速に耐性化が進行している呼吸器感染症の主たる原因菌である肺炎球菌とインフルエンザ菌を全国規模で収集し、それらに対し感性／耐性を識別できる再構築された primer の精度の検証を行ない、PCR による迅速法が臨床での使用に耐えうるか否かを明らかにした。PCR 法の識別精度は 95%以上であること、結果を得るまでの所要時間は 2～2.5 時間であることを疫学解析によって証明した。さらに、全国 225 医療機関の細菌検査室の協力によって組織された「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究」において、2 年間に収集された髄膜炎ならびに敗血症由来の肺炎球菌 315 株、インフルエンザ菌 400 株に対しても、迅速検索としての PCR 法が施行された。2.5 時間で重症感染症における起炎菌の感性／耐性の結果が得られることは、入院 24 時間以内に最も適切な抗菌薬へと変更することが可能であることを証明した。本 PCR 法の臨床への導入は、患者に対してのみならず、医療経済効果(cost effective)の視点からも、入院期間の短縮へ確実につながり、極めて有用であると結論された。

研究協力者 北里大学北里生命科学研究所，
感染情報学研究室

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

的環境要因の変化による保育園児の増加等が耐性化に拍車をかけていることが指摘されている。

耐性菌を防止するためには、検出菌の感受性を短時間で正確に判断できる手法を確立し、その成績に基づいて最も適切な抗菌薬が選択され投与されることが必要である。すなわち，*empiric therapy* ではなく，*evidence* に基づいた化学療法（EBM）の普及である。

このような目的から、私達は高い精度で検出菌の感性／耐性を識別できる「PCR 迅速検索キット」の構築を模索してきた。本事業の中で収集された菌株を対象とし、構築された PCR 法が臨床の現場での使用に耐えうるものか否かの検証を行うことを目的とした。

A. 研究目的

呼吸器感染症や化膿性髄膜炎の主たる起炎菌である肺炎球菌とインフルエンザ菌において急速に耐性化が進行している。この耐性化は世界的な傾向でもあるが、その背景には、出現した耐性菌の耐性レベルが経口抗菌薬をヒトに投与した際の血中あるいは組織への移行濃度を上回っていることにあると考えられる。加えて、本邦においては、血清型 b のインフルエンザ菌に対するワクチン接種が未実施であること、社会

B. 研究方法

1) 対象菌株：平成 13 年 11 月以降，平成 14 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 382 株，インフルエンザ菌 368 株，化膿性髄膜炎由来：肺炎球菌 140 株，インフルエンザ菌 213 株)。

2) primer：肺炎球菌の β -ラクタム系薬耐性を識別する primer は，耐性化に影響する遺伝子上の変異箇所を特定して設計した。PCR は *pbp1a*，*pbp2x*，*pbp2b* 遺伝子とマクロライド系薬剤に耐性を与える遺伝子についても解析した。

インフルエンザ菌の β -ラクタム系薬耐性の識別は，本邦で特異的に増加している PBP3 変異変異を解析し，BLNAR を軽度耐性 (Low-BLNAR) と明らかな耐性 (BLNAR) に識別できる primer として設計した。

3) 倫理面への配慮：収集された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。

C. 研究結果

1) 肺炎球菌に対する耐性遺伝子の迅速検索

図 1 には今までに遺伝子解析された化膿性髄膜炎由来の肺炎球菌が送られてきた病院の内訳を示す。最も多いのは市立病院クラス，次いで私立の大学医学部付属病院であった。緊急を要するこれらの症例は，救急患者に対する診療体制が整っている地域中核病院を受診していることが明らかである。

図 2 には，送付を受けた後，直ちに実施された PCR による遺伝子解析成績と年齢との関係を示す。

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，この点が後述する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 2 対 1 と年次的に成人例が増加していた。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て短時間で重篤化し，神経内科，救命救急センター，あるいは脳外科などへ搬送される例が多かった。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半数を占めた。

PRSP の分離された症例は小児の方がやや多いが，成人例との間に有意差は認められなかった。

図 3 には小児と成人例における予後不良例を示す。PRSP に対する治療抗菌薬としては，カルバペネム系薬が抗菌力，殺菌力ともに優れ，その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 $\mu\text{g/ml}$ でカバーしていた。セフトキシムや日本で開発されたいわゆる第三世代セフェム系薬の抗菌力は明らかに劣っており，無効例の多いことが示された。

髄膜炎治療に際しては，髄液中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おり，起炎菌が PRSP の場

合にはパニペナムでも2~3 μ g/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ものと推定された。

化膿性髄膜炎を後遺症なく救命するには、この研究で確立されたPCR法による起炎菌の耐性遺伝子検索を臨床へ導入し、その耐性レベルを正確に把握し、担当医がタイミングを逃さずに最も適切な抗菌薬へと変更することが必要であると結論された。

1) インフルエンザ菌に対する耐性遺伝子の迅速検索

インフルエンザ菌が β -ラクタム系薬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。その耐性機構に基づく定義を先に示すと、①耐性遺伝子を持たないABPC感性菌はBLNAS、② β -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)、④ β -lactamase産生+PBP3変異株はBLPACRと略称される。

BLNARでは隔壁合成酵素のPBP3遺伝子(*ftsI*)上に変異が生じており、そのうちの3ヶ所の変異が耐性化に関与している。1ヶ所のみ変異した株は耐性レベルが低いのでLow-BLNAR、2ヶ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しており(16-64倍低下)、BLNARとして区別される。

私達の基礎研究より構築されたprimerによる化膿性髄膜炎由来のインフルエンザ菌に対する感性/耐性の識別と発症年齢との関係は図4に示す。これらのほとんどが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。すなわち、図5に示すように、BLNASは20%台へと激減し、TEM-1産生のBLPARも減少していた。次いで、Low-BLNARが30.0%、BLNARが昨年の7.9%から20%以上へと激増していた。1999年までの化膿性髄膜炎由来株には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、二つの耐性機構を有するBLPACR IとIIも10%超えてきており、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となった。

発症年齢をみると、1歳未満が多く、次いで1歳台となっており、2歳以降4歳まで暫時減少し、5歳以上の発症例はめったにみられないことが示された。社会環境の変化に伴い、発症年齢が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ケースの発症率が高かった。

このような耐性菌増加の背景には、我が国で好まれる経口 β -ラクタム系薬(ペニシリン系薬とセフェム系薬を含む)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げられる。

一方、経口抗菌薬が前投与されていた症例では、アンピシリン、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大

部分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、臨床において細菌学的効果はほとんど期待できないことを窺わせた。

抗菌薬を使用しても耐性菌が残存することは、投与薬が臨床的・細菌学的に無効であるばかりでなく、免疫学的に未熟な小児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。

問題は、従来の治療法によって後遺症を残す例がどの程度認められるかということであるが、図 6 に示すように、重篤な後遺症残存例が 24%に認められていることである。

このような症例に対しては、従来推奨されてきた初期治療法は適応とならず、新たな治療方法の確立が早急に望まれる。

そのためには、本研究によって確立された PCR 法によるインフルエンザ菌の耐性遺伝子解析を迅速に行い、初期治療薬の選択を行うことが必要である。

D. 考察 および E. 結論

本研究において最終的に確立した耐性肺炎球菌と耐性インフルエンザ菌を迅速に識別できる PCR 法は、この 2 年間で「迅速診断 kit」として有用であることが証明できたと考える。PCR 法の導入は、①不必要な抗菌薬の使用抑制、②副作用の軽減、そして③入院期間の短縮による医療費削減、などに役立つと結論された。

将来、検査室において、本 PCR 法が使用で

きるようになることが最も望ましいと考える。

F. 研究発表 論文

1. 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. influenzae* strains by a disc method. *J. Infect. Chemother.* 8:65-74, 2002
2. K. Hasegawa, K. Yamamoto, N. Chiba, S. Iwata, K. Nagai, M.R. Jacobs, PC Appelbaum, K. Sunakawa, and K. Ubukata.: Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbial Drug Resistance*, 9: 39-46, 2003
3. 生方公子 他：本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学. *日化療誌*, 50:794-804, 2002
4. 生方公子 他：本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学. *日化療誌*, 51:60-70, 2003

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 4 ; 平成 15 年 1 月 20 日発行

学会発表

1. Chiba N., K. Hasegawa, R. Kobayashi, K. Sunakawa, and K. Ubukata.: PFGE typing analysis and antibiotic resistance patterns of *Haemophilus influenzae* from Meningitis patients. 42th ICAAC, Poster #1483
2. 生方 公子 他：化膿性髄膜炎例から分離されたインフルエンザ菌における急速な耐性化。日本小児感染症学会(札幌) 2002年11月9日
3. 生方 公子 他：化膿性髄膜炎例から分離された肺炎球菌の解析。日本小児感染症学会(札幌) 2002年11月9日

図1. 病院クラス別・肺炎球菌感染症例の内訳



社会保険病院, 厚生連関連病院,
(財)系病院, など

図2. 化膿性髄膜炎例の年齢分布と分離菌の耐性化状況 (n=182)

