

たプラスミド p18-TcE と、*orf2* 中の *NsiI* サイトを破壊し *orf2* のフレームを除いたプラスミド p18-TcN を作成した(表 2)。続いてファージ 80 $\alpha$  を利用し、BB255, BB938 ならびに BB938D にこれらのプラスミドを導入した。これらの株のテイコプラニン、バンコマイシン感受性測定結果を表 3 に示す。

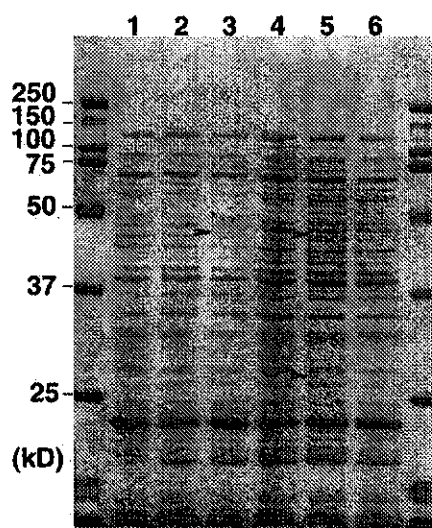
表 3

strain	teicoplanin MIC $\mu\text{g/ml}$	vancomycin MIC $\mu\text{g/ml}$
BB255 (pAW18)	3	3
BB938 (pAW18)	8	3
BB938D (pAW18)	3	2
BB938D (p18-Tc)	6	3
BB938D (p18-TcE)	3	2
BB938D (p18-TcN)	6	4

*orf1* をもつ p18-Tc ならびに p18-TcN では相補作用が見られたのに対し、*orf1* を持たない pAW18 ならびに p18-TcE では耐性の回復は見られなかった。また、*orf1* は、バンコマイシンに対する感受性にも影響を与えることが示された。これらの株に対する Northern 解析では、p18-Tc ならびに p18-TcN を持つ株において *orf1* をふくむ mRNA が p18-TcE を持つ株より大量に検出され、*orf1* 産物は自身の発現を正に調節していることが示された (data not shown)。

つぎに、これらの株における細胞全蛋白を SDS-PAGE にて比較した (図 2)。

図 2



lane1, BB255 (pAW18)

lane2, BB938 (pAW18)

lane3, BB938D (pAW18)

lane4, BB938D (p18-Tc)

lane5, BB938D (p18-TcE)

lane6, BB938D (p18-TcN)

*orf1* 産物が存在しない BB938D (pAW18) [lane 3] と BB938D (p18-TcE) [lane 5] において 45 kD の蛋白の産生が多くみられた (矢印)。また、BB938D (p18-TcE) [lane 5] では 30 kD の蛋白も他の株に比して多く見られた (矢印)。これらの株はテイコプラニン感受性である (表 3)。

#### D. 考察

前年度までの研究により、*SmaI*-E 断片上のテイコプラニン感受性に影響を与える因子はリプレッサーであることが予想されていた。今年度の研究により、*orf1* が存在しない株では、存在する株に比べて 45 kD, 30 kD の蛋白が多く見られ、これらの蛋白発現は *orf1* 産物によって直接、ないしは間接に抑制されていると考えら

れた。1次元電気泳動パターンからではこれ以上の解析は不可能で、より深い解析には2次元蛋白泳動を行う必要がある。現在までに、テイコプラニンの感受性に影響を与える遺伝子として *tcaRAB*, *rsbW/sigB*, *femA*, *femC/glnA*, *femD* が知られている。本年度の研究ではこれらに加えて、新たに発現調節因子がテイコプラニン、バンコマイシンの感受性に影響を与えることが示された。今までに知られている他の発現調節因子としては *sigB* があるが、これは多くの産物の発現調節を行っており、そのうちの何が実際にテイコプラニンの感受性に影響を与えているかは不明のままである。今回解析した *orf1* が *sigB* と独立した因子なのか、そのカスケードの中に入るのかもわかっていない。また、この研究に加えて、広域転写調節因子のひとつである *sar* に影響を与える因子 *msrR* がテイコプラニンの感受性にも影響することが見出されている(発表論文参照)。臨床分離のテイコプラニン耐性株、ならびにバンコマイシン低感受性株において、これらの因子がどれだけその感受性に影響を与えているかの解析が必要である。

#### E. 発表論文

*MsrR*, a novel cell envelope-associated element involved in *Staphylococcus aureus sarA* attenuation. J. Rossi et al. submitted.

厚生科学研究費補助金  
(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および迅速診断法に  
関する研究事業) 分担 研究報告書

嫌気性菌に対する微量液体希釈法の問題点とその改良

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 教授  
研究協力者 田中香お里、石郷潮美、川村千鶴子、松岡喜美子

研究要旨

これまでの著者らの一連の研究から、抗菌薬感受性に関する資料がほとんどなかった化膿性感染症由来の *Fusobacterium* のような気難しい嫌気性菌群にも、抗菌薬耐性化傾向が認められたことから、そのサーベイランスが必須であることが明らかになった。

微量液体希釈法による感受性測定法は今日の医療の現場で最もよく使用され、しかも最も信頼性の高い感受性測定法のひとつである。Frozen plate を用いる方法 (Frozen plate 法) と Dry plate を用いる方法 (Dry plate 法) とがあるが、現場では Dry plate 法が普及している。さて、通性菌では、Frozen plate 法と Dry plate 法での成績の間の乖離は問題となっていないが、嫌気性菌では、通性菌の場合と異なり、Frozen Plate を用いて検討制定された現在の標準法に準じて Dry plate 法を行っても、*Fusobacterium* や嫌気性球菌群などの臨床的に重要な嫌気性菌の薬剤感受性の測定が不可能である事実が明らかになっている。サーベイランスを実施するためには微量液体希釈法の標準法を改訂する必要がある。

今回の検討から、微量液体希釈法の標準法の感受性測定培地を、ABCM 培地ベースから今回検討した Brucella broth ベースに切り替えることにより、*Fusobacterium* と嫌気性球菌群の Dry plate 法による感受性測定が可能となることが知られた。

A. 研究目的

*Fusobacterium nucleatum* に Penicillin 耐性株 (Beta-lactamase 産生菌) が相当存在するとの報告が欧米で見られた。(P. Appelbaum ら) しかし、この点に関して、当時、日本での報告は皆無であった。しかし、問

題は確認調査を開始するにも *F. nucleatum* 菌株の十分な保存はなかったことであった。すなわち、欧米で報告されたこの事実が、わが国でも存在する現象であるのかどうかを明らかにするためには、まず、わが国では *F. nucleatum* を臨床材料から分離することから始める必要があった。そ

ここで、第二次医療施設との共同で、現時点で最も理想的と思われた方法による *Fusobacterium* の分離を開始した。簡便な嫌気性菌培養法が普及した今日でも、日本では *Bacteroides* 以外の嫌気性グラム陰性桿菌や嫌気性球菌を分離するシステムに一種の欠陥があることが明らかとなった。より適切な方法に置き換えることにより、予想にたがわず、わが国におけるこれまでの研究報告の中では認められなかった高い頻度で、*F. nucleatum* が臨床材料から分離されることが明らかになった。さらに、それらの分離株の抗菌薬感受性の検討から、*F. nucleatum* の約半数の株が Dry plate 法では MIC 測定ができないことを確認する結果となった。また、これらの株の抗菌薬感受性を寒天平板希釈法（化学療法学会標準法）と E test で測定したところ、*F. nucleatum* 分離株の中には、Appelbaum らの指摘したような Beta-lactamase 産生菌の存在は認めなかったものの、いくつかの抗菌薬に細菌学的耐性株が存在することが明白になった。これらの細菌学的耐性株は、胸膜肺感染症（下気道感染症）の領域では、その MIC から判断すると臨床的耐性となる可能性が示唆されるレベルであった。すなわち、欧米の状況とわが国の状況には明らかな相違があり、わが国独自の調査研究が必須であることを示した。今回は、*Fusobacterium* の感受性測定を可能にする微量液体希釈法 Dry plate 法の条件について再検討を行っ

た。

## B. 研究方法

### 1. 微量液体希釈法（化学療法学会標準法）

接種菌液：ドライプレートを使用する。感受性 ABCM Broth で、2 McFarland の濁度に調整するその 0.025ml を感受性 ABCM Broth 12ml に加える。その 0.1 ml をウェルに接種する。  
( $10^5$  cfu/ ウェル)

判定：35°C 40～48 時間培養後とする。

### 2. 感受性 Brucella Broth の保存株を用いた質的評価

感受性 ABCM Broth を感受性 Brucella Broth に替えて検討した。

岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設の保存 26 株 (*P. anaerobius*, *P. asaccharolyticus*, *P. indolicus*, *F. magna*, *M. micros*, *S. intermedius*, *P. acnes*, *E. lenta*, *B. fragilis* (2), *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. eggerthii*, *B. ureolyticus*, *C. gracilis*, *P. bivia*, *P. intermedia*, *P. oralis*, *P. oris*, *F. nucleatum*, *F. varium*, *B. wadsworthia*, *V. parvula*, *C. perfringens* および NCCLS quality control strains を用いた。

### 3. 試験培地

NCCLS 法で採用されている感受性 Brucella Broth (Brucella Broth

powder (BBL) 28g+ Hemin (SIGMA) 5mg/L + Vitamin K1(Wako) 1mg/L+Distilled Water 850ml + Lysed Horse Blood(5% 150ml) の処方を用いた。

### C. 研究結果

感受性 Brucella Broth の定性的評価 (接種菌量  $1 \times 10^6$  cfu/ml での検討)

感受性 ABCM Broth でも感受性 Brucella Broth でも MIC 測定が不可能であった株は、*Prevotella oralis* であった。感受性 ABCM Broth では MIC 測定が不可能であったが、感受性 Brucella Broth では MIC 測定が可能であった株は、*Peptostreptococcus anaerobius*, *P. asaccharolyticus*, *Prevotella bivia*, *P. oris*, および *F. nucleatum* であった。感受性 ABCM Broth でも感受性 Brucella Broth でも共に MIC 測定が可能であった株は、*Fingoldia magna*, *P. acnes*, *Eggerthella lenta*, *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. uniformis*, *B. eggerthii*, *B. thetaiotaomicron*, *F. varium*, *B. wadsworthia*, *V. parvula*, *C. perfringens*, および *S. intermedius* であった。

### 2. 感受性 Brucella Broth の精度管理菌株を用いた評価

Table 1~3 に NCTTC での精度管理菌株 3 株の ABCM broth および Brucella broth を感受性測定用培地として用いた場合の MIC 測定結果を比較した。備考欄には、NCCLS で提示されている薬剤に対してのみではあるが、MIC の許容範囲を示した。提示されているものに対しては、ABCM

broth での *B. thetaiotaomicron* と Clindamycin の 1 つの組み合わせ以外の組み合わせのすべてで、許容範囲内にあった。

Table 1. NCCLS 精度管理菌株 *B. fragilis* ATCC25285 の MIC

薬剤	Brucella Broth	ABCM Broth	備考
PCG	8	8	
ABPC	>8	>8	
PIPC	8	2	4-16
CZX	8	2	
CMZ	8	2	
FMOX	<0.5	<0.5	
IPM	0.25	0.25	0.03-0.25
ABPC/CVA	0.5/0.25	0.25/0.12	
CLDM	1	0.5	0.5-2
MINO	0.25	0.12	
SPFX	2	1	
CP	4	2	

Table 2. NCCLS 精度管理菌 *B. thetaiotaomicron* ATCC29741 の MIC (n=3)

薬剤	Brucella Broth	ABCM Broth	備考
PCG	8->8	8	
ABPC	8->8	>8	
PIPC	8-32	8	8-64
CZX	4-32	4->64	
CMZ	32->64	32-64	
FMOX	4-16	4-64	
IPM	0.5~5	0.5	0.25-1
ABPC/CVA	0.5/0.25-2/1	0.5/0.25	0.5/0.25-2/1
CLDM	2	1	2-8
MINO	4	2-4	
SPFX	1-2	1-2	
CP	4-16	2-4	

Table 3. NCCLS 精度管理菌 *E. lenta* ATCC43055 の MIC (n=3)

薬剤	Brucella Broth	ABCM Broth	備考
PCG	0.5-1	0.5-1	
ABPC	1-2	1	
PIPC	8-16	16	8-32
CZX	16-32	16-32	16-64
CMZ	4-8	4-8	
FMOX	4-8	4-8	
IPM	<0.12-1	0.25-1	0.125-0.5
ABPC/CVA	0.5/0.25-1/0.5	1/0.5	
CLDM	0.25	<0.06-0.12	0.06-0.25
MINO	1-2	1-2	
SPFX	0.5-1	1-2	
CP	4	4	

#### D. 考察

*Bacteroides* に比し、酸素に感受性の *Prevotella* や、*Prevotella* よりさらに酸素感受性である *Fusobacterium* や嫌気性球菌群などを含む複数菌感染症は予想以上に多く認められ、その感染症の治療の質の向上のためには、*Bacteroides* の感受性さえ測定できれば十分であるとするこれまでのような消極的な考えから脱却し、より気難しい嫌気性菌の分離法ができる検査法と感受性測定法の採用が必要であると考えられる。微量液体希釈法は、日本化学療法学会の小会委員会での検討の結果、*Fusobacterium* の感受性測定をも可能である方法として当初推奨された。しかし、現実には測定

ができなかった。その要因として、この標準法検討の際に使用された Frozen plate は実際にはほとんど現場で使用されず、標準法設定後に開発された Dry plate 法が主に行われたことによると考えられた。Dry plate 法による感受性測定には、Frozen plate 法の場合とは異なる条件設定が求められることを意味している。今回は、*Fusobacterium* など Dry plate 法では感受性測定がむつかしかった嫌気性菌群の感受性測定が可能な Dry plate 法の測定条件の見直しを行った。

今回の嫌気性菌参考菌株の多数株と NCCLS で使用されている参考菌株を用いて検討した結果から、感受性 Brucella broth は、従来の ABCM Broth に替えることができる嫌気性菌感受性測定用培地であると考えられ、現在臨床分離株を用いた検討を実施している。

ところで、微量液体希釈法 NCCLS 標準法での測定条件は、もともと *Bacteroides* を限定対象として制定されたものであり、*Bacteroides* 以外の酸素感受性嫌気性菌群に対する感受性の測定は、現在困難である。しかし、改定の必要性が強く認識されており、それを可能とするための基礎的研究が米国でも進行している。欧米のごく最近の現況は、気難しい嫌気性菌の感受性測定を可能にする他の、判定 24 時間後の時代へと進んでいる。わが国でも、このような時代への適切な対応が必要である、すなわち、米国で開発中の 24h-Anaerobe Enrichment broth の動向を見守るとともに、わが国で、微量液体希釈法による *F. nucleatum* と嫌気性球菌群の

感受性測定に成功している細菌学者、または臨床検査技師が使用している培地があれば、判定 24 時間後の視点から評価しなおすべきである。本邦では、気難しい通性菌に対して使用されている MH ベースの培地を、嫌気性グローブボックス中の厳密な嫌気性環境下で使用し、*Fusobacterium* の感受性測定に成功している検査技師がいることから、今後これらの成績についても検討する価値があると考ええる。

F. 健康危険情報      なし

G. 研究発表      なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

平成14年度厚生科学研究

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（H12-新興-19）

班会議 日時：2003年1月15日（水）10：30 A.M.

場所：東京都新宿区戸山一丁目23番1号

国立感染症研究所 共用第2会議室



## 演 題

氏 名

- |   |       |
|---|-------|
| 1. アミノグリコシド耐性菌のレファレンス因子の特定と迅速簡便検出法に関する研究                            | 堀田 國元 |
| 2. 臨床分離緑膿菌の多剤耐性化に機能する排出システムの性状解析と簡便検出法の開発                           | 後藤 直正 |
| 3. 異物・抗生物質排出ポンプの作動機作からポンプ阻害剤開発の可能性を探る                               | 中江 太治 |
| 4. 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 | 生方 公子 |
| 5. 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン感受性に影響を与える因子の解析                                   | 和田 昭仁 |
| 6. 無芽胞嫌気性グラム陰性桿菌の感受性測定法の再検討 —微量液体希釈法—                               | 渡邊 邦友 |
| 7. 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                                    | 井上 松久 |
| 8. 多剤耐性 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> のカルバペネム系抗菌薬に対する耐性機構の解明        | 山口 恵三 |
| 9. アルベカシン高度耐性緑膿菌の耐性機構の解析  | 荒川 宜親 |
| 10. 臨床分離フルオロキノロン高度耐性菌の耐性遺伝子の解析およびキノロン感受性に影響を与える因子に関する研究             | 山本 友子 |
| 11. バンコマイシン耐性腸球菌のバンコマイシン耐性プラスミドの伝達性                                 | 池 康嘉  |

## アミノグリコシド耐性菌のレファレンス因子の特定と迅速簡便検出法に関する研究

分担研究者 国立感染症研究所生物活性物質部 堀田国元

研究協力者 土崎尚史、石野敬子、石川淳

### 1. 3年間の研究成果の概要・要旨

Colony direct PCRによる遺伝子プロフィルの迅速チェック法をMRSAにおいて確立し、アミノグリコシド (AG) 耐性のレファレンス因子を特定するために、8種のAG (KM系4種、GM系4種) に対する耐性とAG修飾不活性化酵素 (AME) 遺伝子プロフィルとの相関性を調べ、以下の成果を得た。

#### 1) 初年度 (平成12年度) :

##### ① Multiplex Colony Direct PCRによる遺伝子プロフィルチェック法の確立

複数の既知 AME 遺伝子のプロフィルを迅速簡便に再現性よく検出する方法として、コロニーから超微量の細胞を爪楊枝によって直接 PCR 反応液に添加してそのまま PCR 増幅反応を行う Multiplex Colony Direct PCR (CD-PCR) 法を確立した。また、黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ遺伝子について3'領域の Direct repeat を標的として CD-PCR を行い、増幅産物を直接制限酵素 *AfuI* 処理して得られる切断パターンにより遺伝子多型 (RFLP) を調べる系を確立した。

##### ② 98年に全国の病院でABK耐性MRSAとして報告された43菌株の解析

- ・ アルベカシン (ABK ; 抗MRSA剤) 耐性と二機能酵素遺伝子 *aac(6')*/*aph(2'')* の間に相関性を認めた。
- ・ *mecA* と *aac(6')*/*aph(2'')* の両方が検出されたのは43株中21株で、ABK耐性MRSAの同定精度に問題が認められた。なお、ABK非耐性MRSAの同定精度は高かった。
- ・ コアグラーゼ遺伝子では、L21とコード番号を付けたものが圧倒的に多く、特に *aad(4')*, *4''* だけが検出されたMRSAとの相関性が高いことから、L21はコアグラーゼII型との相関性が強く示唆された。

2) 第2年度 (平成13年度) : Multiplex CD-PCRによる80年代後半と90年代後半の菌株(230株)の比較結果を表1に要約した。AMEプロファイルとAG耐性の高い相関性から、依然としてAMEが主要なAG耐性因子であることが認められた。ABK耐性に関して、*aac(6')*/*aph(2'')* は必要であるが、必要十分ではなく、宿主のコアグラーゼRFLP型との相関性から未知の要因の存在が考えられた。また、ABK耐性化はほとんど進行していないと判断された。

表1. 80年代と90年代のMRSA菌株の比較結果

AME プロファイル	80年代 (50株)	90年代 (180株)	AG 耐性
1) <i>aad(4')</i> , <i>4''</i> のみ	22%	53%	KM, DKB, AMK 及び ISP
2) <i>aad(4')</i> , <i>4''</i> と <i>aac(6')</i> / <i>aph(2'')</i>	30%	42%	ABK (一部耐性) 除くすべて
3) <i>aac(6')</i> / <i>aph(2'')</i> のみ	40%	4%	ABK・ISP (一部耐性) 除くすべて
4) <i>aac(2')</i> / <i>aph(2'')</i> と <i>aph(3')</i>	8%	1%	同上
コアグラーゼ遺伝子 RFLP 型			
1) L21	36%	93%	90年代菌株の一部にABK耐性
2) L31	34%	2%	
3) M22	22%	3%	80年代も90年代にもABK耐性

### 3) 第3年度(平成14年度)

70年代末~02年の数百菌株(MRSA:400株超、MSSA:200株超)について解析を行い、その結果をデータベース化し、いろいろな切り口から解析を行った結果、以下のことが明らかになった。

- ① 臨床において支配的な宿主株が経年的に変遷しており、90年代に入ってからRFLPがL21型のコアグラマーゼ型を持つ菌株が急速に支配的になっていることが明らかとなった。
- ② コアグラマーゼ型によってAME遺伝子プロフィールに特徴があり、耐性パターンとの明瞭な相関性があることが明らかとなった。
- ③ GM系のGM, SISO, NTLおよびKM系のABKに対する耐性のレファレンス因子として二機能酵素遺伝子*aac(2')*/*aph(2'')*が特定された。但し、ABK耐性に関しては、耐性発現はGM系よりも明瞭に低いことが認められた。
- ④ 二機能酵素遺伝子を保持する菌株は、80年代前半に高率に存在し、ABKが臨床に導入された(1990年)頃から低下傾向にあることが明らかになった。
- ⑤ 以上の状況から、ABK耐性化は今後も低く推移すると判断された。

### 2. 行政施策への貢献の可能性

- 1) 確立したCD-PCRは、DNA抽出操作が全く不要であり、臨床検査室レベルでも容易に導入できる技術なので、数時間のうちに多数の菌株の遺伝子プロフィールをチェックすることができ、AG耐性の遺伝因子を特定することが可能となる。また、菌株同定や耐性判定の精度を向上させる上で有効である。
- 2) MRSAでは、AG耐性をAME遺伝子プロフィールから推定できる。
- 3) AME遺伝子情報を簡便迅速に得ることは、AG抗生物質(特に抗MRSA剤のABK)の適正使用のための基本情報として積極的に有効使用すべきであると思われる。

### 3. 発表論文

- 1) 土崎尚史、石川淳、堀田国元：コロニーPCRによるMRSAおよび腸球菌の薬剤耐性遺伝子の迅速検出。 *Japanese J. Antibiotics* 53: 422-429 (2000).
- 2) 堀田国元、土崎尚史、石野敬子：MRSAのアルベカシン耐性はなぜ新興しないのか。 *月刊薬事* 44(7): 1263-1267(2002)

## 臨床分離緑膿菌の多剤耐性化に機能する排出システムの性状解析と簡便検出法の開発

京都薬大・微生物（研究代表者）後藤直正；（研究協力者）村田 健、西野武志

異物の細胞外への排出に働く異物排出システムは生物界に広く分布し、さまざまな機能を担っている。細菌にあつては、異物排出システムによる抗菌薬や消毒薬の細胞外への排出によって、抗菌薬や消毒薬に対する耐性が引き起こされる。さらにこの排出機構の基質域が広いことから単なる同系統の抗菌薬耐性ではなく、広域多剤耐性化が起こることが抗菌薬治療を困難にしている。本組織は、抗菌薬や消毒薬に自然耐性を示し、さらに抗緑膿菌活性が高い抗菌薬にまで耐性を示す株が増加している緑膿菌の染色体にコードされた多剤排出システムの同定と抗菌薬および消毒薬耐性への寄与に関する研究を実験室変異株を用いて行ってきた。さらに、得られた成果を臨床分離株で検証した。

### 研究成果

#### 1) 新規多剤排出システム MexXY-OprM および MexJK-OpmH の同定と性状解析

既知の多剤排出システムとは異なり、外膜コンポーネント遺伝子をコードしていない新規多剤排出システムオペロン *mexXY* および *mexJK* にコードされた MexXY には OprM が共同的に働き、キノロン薬やアミノ配糖体薬耐性に寄与すること、また MexJK は OpmH の補助によってトリクロサン耐性に働くことが明らかにした。

#### 2) 多剤排出システムの適応的発現の臨床的意義

新規排出システム MexXY-OprM や既知の多剤排出システム MexCD-OprJ は生育環境化に存在する異物に対して適応的に発現することが分かった。これらは、緑膿菌の抗菌薬に対する *in vitro* 感受性と感染部位での感受性が異なる可能性を示すものであり、臨床での抗菌治療薬の選択に新たな問題を提起するものである。

#### 3) 臨床分離緑膿菌における抗菌薬耐性への多剤排出システムの貢献

臨床各科から分離された緑膿菌 104 株での抗菌薬感受性と多剤排出システムの発現をすでに作成した特異抗体を用いて調べた。その結果、キノロン薬耐性には MexAB-OprM と MexXY-OprM が、アミノ

配糖体耐性には MexXY-OprM が重要な役割を担っていることが分かった。一方、カルバペネム薬耐性は MexAB-OprM と MexXY-OprM によって引き起こされるがその程度はカルバペネム薬間で異なることが分かった。これらの結果は、現在臨床で使用されている主要な抗菌薬に対する緑膿菌の耐性の実態を調べるには MexAB-OprM と MexXY-OprM の発現を調べる必要性を示唆している。

#### 4) 多剤排出システムの基質認識機構の解析

マルチコンポーネント型多剤排出システムの基質認識は RND タンパク質によって担われている。この基質認識(選別)の機構を調べるために、臨床分離株から MexB および MexD 遺伝子をクローン化し、基質認識変異体の検索を行った。得られたクローンの解析により基質認識に寄与するアミノ酸残基の同定を行った。その結果、MexD タンパク質の二次構造から予測されるペリプラスムループに基質認識のドメインがあることが分かった。これは排出システムの機能に対する阻害薬の創製に大きな情報を提供するものである。

#### 研究計画

今年度までの研究で、緑膿菌の抗菌薬耐性の実態調査には、多剤排出システム発現の検出は必要不可欠な項目であることが示された。現在、発現検出には当組織で開発した特異抗体を使用しているが、これによる検出は抗体使用の限度もあり、拡大的な適応は困難である。そこで、抗体によるタンパク質レベルでの検出を RT-PCR による mRNA レベルでの検出によることは可能かどうか、その方法の構築を行い、実際の臨床分離株の解析に応用することを計画している。

## 異物・抗生物質排出ポンプの作動機作からポンプ阻害剤開発の可能性を探る

東海大学医学部 中江 太治

院内感染起因菌として最も重要視されている細菌の一つである緑膿菌は、抗生物質に非特異的自然耐性を示し、また抗生物質に曝されることによって非特異的高度耐性を獲得する。これらの非特異的耐性は多くの場合抗生物質を細胞外に排出するトランスポーター（ポンプ）が係っている。本研究では異物・抗生物質排出ポンプの構造及び作動機作を研究することによって、将来ポンプ阻害剤開発の手掛かりとなるような基礎データを提供することを目的とした。

さて、本研究期間中に多くの研究が進行し成果が得られたが、すべてを記載するには紙面の制限があるので主なものを取り上げて記述する。

### 1. MexAB-OprM 排出ポンプサブユニットの膜トポロジーについて

すでに我々はこのポンプの本体である MexB のトポロジー解析を終えており、MexB は膜を 12 回貫通するポリトピック型トランスポーターであることを明らかとしてきた (J. B. C. 274, 10517-10522, 1999)。そこで MexA サブユニットの膜トポロジーをそのシグナルペプチドを遺伝子上で変異させることによって調べた結果、MexA は内膜に脂肪酸を介して結合し、ポリペプチド部分のほとんどをペリプラズムに露出したりポ蛋白であることが明らかとなった (J. B. C. 275, 4628-4634, 2000)。次にこのポンプの外膜サブユニットである OprM のトポロジーを調べたところ、OprM は脂肪酸を介して外膜に結合し、その蛋白部分は大きくペリプラズムに突出している構造であることが明らかとなった。この事実は一般に受け入れられている OprM のポーリン様構造の仮定を覆すものであった (J. B. C. 275, 30064-30068, 2000)。

### 2. MexB サブユニットの膜貫通領域 (TMS) の構造とエネルギー変換部位について

MexB ポンプが作動するためのエネルギー変換部位の探索を行った。そのために TMS に分布する 5 ケの荷電を有するアミノ酸残基に変異を導入することによってその機能を調べた。その結果 TMS-4 に存在する Asp407、Asp408 及び TMS-10 に存在する Lys939 の三つの残基が互いに近くエネルギー変換のプロトンの通過路を形成している可能性を示した (J. Bacteriol. 183, 1734-1739, 2001)。一方 TMS-10 に存在する機能を失活させる変異から機能復帰変異株を分離し解析したところ、2 次変異は TMS-4 に存在することが明らかとなり上記の結果と一致した結論を得た (B. B. R. C. 292, 513-518, 2002)。

### 3. MexAB-OprM をコードするオペロンの発現制御について

このオペロンは野生株で低レベルに発現されており、*nalB* 変異株では高レベルに恒常的に発

現されている。その仕組みを明らかとするため 20 株の *nalB* 型変異株を調べたところ、すべての変異はこのオペロンの上流に位置する *mexR* にあることがわかった (FEMS Microbiol. Lett. 195, 23-28, 2001)。更に DNA 結合能を失した MexR の結合位置を調べたところ、それは *mexR* と *mexA* の間にあり、それらのほとんどの変異は MexR の DNA 結合ドメインにあることが明らかとなった (投稿中, 2003)。

#### 4. MexEF-OprN ポンプのアセンブリーについて

排出ポンプの *in vivo* でのアセンブリー機序を知るべく、MexF 欠損株及び機能を失した MexF 産生株を分離して MexE 及び OprN の出現を検討した。その結果①MexF 欠損株では OprN が出現せず、野生株で三つのバンドとして検出される MexE が一本になった。②機能を失した MexF を発現する株では OprN は発現せず、MexE は二本のバンドとして現れた。これらの結果から MexEF-OprN のアセンブリーには MexF の存在が必須であり、次に MexE が部分分解を受けることによって OprN が正常に組み込まれるという順序が明らかとなった (Mol. Microbiol. 46, 677-686, 2002)。

#### 5. RND - 排出ポンプの基質認識と異物・抗生物質排出様式について

異物・抗生物質排出ポンプのどの部位で基質が認識されどの様に排出されるかの機序を知ることが重要である。そこで我々は MexB が  $\beta$ -ラクタマーゼを排出し、MexY がアミノグリコシドを排出する性質を利用して MexB と MexY の間でドメインを取替える実験を行った。その結果、MexY の大きなペリプラズムドメイン 2 ケを対応する MexB のそれらと取替えたところ、このモザイク蛋白は  $\beta$ -ラクタマーゼを排出したけれども、もはやアミノグリコシドは排出しなかった。一方 MexB の TMS 領域を対応する MexY の TMS で一つずつ置換したところ、すべての組替体は  $\beta$ -ラクタム剤を排出したけれどもアミノグリコシドはもはや排出しなかった。これらの結果は RND-ポンプがペリプラズムドメインで基質を認識しペリプラズムから直接基質を排出していることを物語っている。これは全く新しい能動輸送系の発見である (J. B.C. accelerated publication, 2003, in press)。

この様にこの 3 年間の研究で多くの基礎的知見が得られた。これらは将来ポンプ阻害剤の開発やポンプ機能の制御に役立つものである。

## 厚生労働省科学研究：新興・再興感染症事業

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 感染情報学研究室)

【目的】市中において発症する呼吸器感染症の主たる起炎菌は肺炎球菌とインフルエンザ菌であるが、これらの検出と感性/耐性を遺伝子レベルで識別する primer については、既に平成 13 年度に再構築を行ない、識別の精度を高めることが可能となっている。しかし、様々な菌種に生じている薬剤耐性化の防止には、起炎菌となりうる細菌をできる限り網羅した迅速検索法を確立し、empiric therapy から evidence に基づいた Chemotherapy(EBC)へ切り替えていくことがぜひとも必要であると考え、今年度はそのことに重点おいて研究を行った。

すなわち、本年度は再構築した primer に、さらに一般細菌が分離されない検体に対する検索用として、マイコプラズマ (*M.pneumoniae*)、クラミジア (*C.pneumoniae*)、A 群溶血レンサ球菌、およびレジオネラ菌(菌種と *L.pneumophila*)の primer を構築し、合計 6 菌種を同時に検索することとした。

### 【方法】

1) 対象とした検体：ひとつは、平成 13 年 4 月から 12 医療施設の小児科医の参加で組織した呼吸器感染症研究会の検査材料で、同年 12 月までに約 700 検体が解析された。もう一つは平成 13 年末でちょうど 2 年間活動した「化膿性髄膜炎・全国サーベイランス」由来の菌株が対象となった。

2) primer の設計：肺炎球菌とインフルエンザ菌の検索用 primer は既に報告したものをを用い、今回新たに A 群溶血レンサ球菌 (ASO 遺伝子)、*M.pneumoniae*、*C.pneumoniae*、*L.pneumophila* 検索用 primer を構築した。これらは各々 16SrRNA 遺伝子検索を対象としており、*Legionella* のみ既に報告されている primer を用い、その他は PCR の条件を揃えるために新たに設計したものである。新 primer は標準株で感度と特異度を確認しているが、結果判定までの所要時間は 2 時間である。

なお、肺炎球菌とインフルエンザ菌の菌種同定と  $\beta$ -ラクタム系薬耐性の識別には、昨年報告した primer を使用した。

【結果】いずれの primer もチューブあたり 10 CFU の被験菌が存在すれば陽性と判定される感度であった。700 検体以上の小児感染症由来の検査材料に対し、6 菌種の直接 PCR を行ったが、疾患としては肺炎例が最も多く、次いで急性気管支炎、急性咽頭炎、上気道炎の順であった。肺炎球菌とインフルエンザ菌の関与は肺炎と急性気管支炎では 60-75%と推定されるが、その他に肺炎例では *M.pneumoniae* の陽性例が 22%と高率に認められ、*C.pneumoniae* も 1.5%認められた。急性気管支炎における *M.pneumoniae* の関与率は 7%、*C.pneumoniae* も 1%であった。急性咽頭炎では A 群溶血レンサ球菌の分離が約半数を占めていた。

一方、化膿性髄膜炎由来の菌株に対してはすべて感性/耐性識別のための PCR を実施、さらに BLNAR と思われる株には耐性にかかわる PBP3 遺伝子の塩基配列の解析を行った。耐性肺炎球菌(PRSP)は小児のみならず成人でも分離されるようになっており、その比率は 2:1 であった。劇症型を呈している例も散見された。小児に多いインフルエンザ菌性化膿性髄膜炎は増加傾向がみられ、その中でも BLNAR が全体の 20%を占めるほどに増加していた。

【考察】耐性菌の増加を防止するためには、一般細菌のみならず培養に時間を要する菌に対する PCR も同時に実施し、できるだけ早く適切な治療薬へと切り替えられるような対策が必要であることが明らかにされた。また化膿性髄膜炎のような重症感染症に対しては、髄液の直接 PCR を実施することにより、治療薬が適切であるか否かが当日に判明すること、EBC の上で極めて有用であろうと考える。



## 黄色ブドウ球菌のテイコブラニン感受性に影響を与える因子の解析

国立感染症研究所 細菌第一部 和田昭仁

昨年、アメリカのミシガン州とペンシルバニア州から、*vanA* を持つ MRSA の臨床分離例が 1 例ずつ報告され、本邦でも、バンコマイシン耐性 MRSA の分離が強く懸念される事態となっている。*vanA* 保持 MRSA はバンコマイシンに対して 32  $\mu\text{g/ml}$  以上の MIC を示すが、*vanA* を持たない臨床分離黄色ブドウ球菌は、本邦で分離された Mu50 株を除き、そのバンコマイシンの MIC は 4  $\mu\text{g/ml}$  が最高である。この低度バンコマイシン耐性発現には複数の遺伝子の変異が必要であろうと考えられているが、その表現型は不安定で、遺伝的解析の障害となっている。バンコマイシンと同系統の薬剤であるテイコブラニンに対する耐性は、これと比べ安定であり、また、耐性菌においては 32  $\mu\text{g/ml}$  程度までの MIC の上昇が見られるため、この薬剤はグリコペプチド感受性に影響を与える因子の解析対象としての利点をもっている。私は、過去 2 年間の研究により、黄色ブドウ球菌の染色体上に存在する遺伝子として、*tcaRAB*、*sigB* がテイコブラニン感受性に影響をもたらすことを示したが、本年は感受性低下に関わるこれ以外の因子の遺伝学的解析結果を発表する。

病院内は、バンコマイシン耐性菌に対する選択圧力が強く働く環境であるにもかかわらず、1988 年にバンコマイシン耐性腸球菌が分離されてから 15 年間以上も *vanA* を保持する MRSA の出現が見られなかった。この原因を、腸球菌から黄色ブドウ球菌へのプラスミドやトランスポゾン伝達頻度で説明することは困難で、VanA 発現に必要な黄色ブドウ球菌染色体の変異の蓄積に時間が必要であったと考えるほうが適切である。グリコペプチドに対する感受性の低下をもたらす複数の変異のうちのどれが VanA 発現に必要なかを明らかにすること、ならびに、それらの変異以外のどんな変異がその上に必要であるかを明らかにすることが、*vanA* 陽性 MRSA 蔓延を防ぐための今後の課題である。

## 無芽胞嫌気性グラム陰性桿菌の感受性測定法の再検討 —微量液体希釈法—

渡邊邦友（分担）、田中香お里、川村千鶴子、松岡喜美子、石郷潮美（協力）

嫌気性培養が普及したといわれる今日でも、*Bacteroides* 以外の嫌気性グラム陰性桿菌が関与する複数菌感染症の正確な頻度は不明のままである。われわれは、嫌気性グラム陰性桿菌の中でももっとも分離が難しい部類の菌に属する *Fusobacterium* spp. を対象にして、この菌が関与する感染症が、日常どの程度存在するかを知るため、1995年から1999年の5年間、某二次医療施設において検討を行った。その結果、*Fusobacterium* spp. 分離感染症症例は、耳鼻科領域感染症、口腔外科領域感染症、肺胸膜感染症、腹腔内感染症、皮膚軟部組織感染症などの合計108症例が存在した。108例からの総分離株数は433株で、症例あたり平均分離菌種数は4.0の複数菌感染症であった。そのうち73例（68%）は通性嫌気性菌と嫌気性菌の混合感染症であり、35例（32%）は嫌気性菌のみの複数菌感染症であった。*Fusobacterium* spp. は、*Prevotella* spp.、*Bacteroides fragilis* group、*Streptococcus milleri* group、*Enterobacteriaceae*、*Peptostreptococcus* spp.、*Staphylococcus* spp. などとともに分離されていた。

*F. nucleatum* の50株を選び、寒天平板希釈法で薬剤感受性を測定し、その成績を解析したところ、NCCLSの感受性側のブレイクポイントを用いた場合、*F. nucleatum* は、自然耐性を示す薬剤であることがわかっているEMを除く9薬剤で、90~100%の範囲の感性率を示した。TCとCLDMには耐性株は認められなかったが、PC系3薬剤には10%に、セフェム系3薬剤には6~10%に、OFLXには4%に耐性株が認められた。*F. nucleatum* 50株中に、 $\beta$ -ラクタム系薬剤に高度耐性の株とOFLXに耐性の株が認められたことから、今後 *Fusobacterium* の耐性の現況を正確に把握していくことは極めて重要であると考えられた。代替法としてのE test法は有用と考えられたが、わが国の検査室環境をみると、その追跡法としては微量液体希釈法が優れており、その改良が急務であると考えた。嫌気性菌全般の菌種に対応できるように、解凍後の培地の予備還元を実施することを義務付けた現行の微量液体希釈法でも、*Fusobacterium* の感受性測定が極めて困難であることはすでに指摘されていたが、今回の検討でもその事実が明白になった。微量液体希釈法の再検討を行っているので、その成績を述べる。

### 行政への貢献

*Fusobacterium* spp. は、*Bacteroides* spp. や *Prevotella* spp. について、感染症における重要な菌群であるが、現実にはほとんど分離されていない。臨床嫌気性細菌学の進歩が見られる今日でもなお、種々の理由で、無芽胞嫌気性菌感染症の診断を正しく実施できる病院検査室は数少ないのである。従って、我が国における本菌の抗菌薬感受性成績や耐性出現の現況や動向は全く不明であった。この研究では、*Fusobacterium* spp. の感受性結果を明らかにし、臨床に意味有る情報を提供している。

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

井上松久、北里大学医学部微生物学

研究協力者：中野竜一、佐藤優子、中野由実子、兼子謙一、小松洋子、岡本了一

研究報告書

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*, *Haemophilus 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sporin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sporin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sporina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sporin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sporin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sporin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sporin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sporin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*<sup>+</sup> 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 0.1 unit/mg protein 以下と著しく抑制され、同時にセファロsporin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。さらに、かかる野生型 *ampD*<sup>+</sup> 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*<sup>+</sup> 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際示唆された。

## (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*<sup>+</sup> 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