

なかった。VのプライマーVanB-WB1, VanB-XB2の組み合わせでは増幅がなされたということと図2から、X_Bの領域の下流において塩基の変異または構造変化が起きていることが考えられる。

また、サザンハイブリダイゼーションの結果から、pUI22にはフェロモン反応性の遺伝子がコードされているということが明らかとなった。これまでもいくつかのフェロモン反応性のプラスミドは報告されており、その遺伝子群の中にフェロモンによる遺伝子の発現を調節するものを含んでいることがわかっている。こうした遺伝子群は各プラスミドの間で相同性がある。^{20,33,34} 今回、菌を培養する過程において、肉眼で判断できるほどの強い自己凝集反応が確認された。このとき、菌は供与菌のみで培養されており、受容菌の分泌する性フェロモンの影響を受けていないはずである。このことは、フェロモン反応を負に調節する遺伝子の領域、traAやtraBなどにおいて、なんらかの変異が起こったためと考えられる。^{33,36} この凝集は接合伝達に重要なだけでなく、菌の哺乳類細胞への侵入性に関連しており、E. faecalis株における病原因子の一つであることが報告されている。³⁷

vanB遺伝子とフェロモン反応性の遺伝子を同時にコードするプラスミドの詳細な構造は、まだ明らかになっていない。このような詳しい解析や実験が、VanB型VREの伝播や院内感染についての理解を深めるために必要である。

文 献

- Reynolds, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1994; 8: 943-950
- Evers, S., P. Courvalin. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS_B-VanR_B two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. J. Bacteriol. 1996; 178: 1302-1309
- Clewell. D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. Cell, 1993; 73: 9-12
- Clewell. D. B. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*, p.349-367. In D. B. Clewell (ed.), Bacterial conjugation. Plenum Press, New York, N.Y., 1993
- Jett, B. D., M. M. Huyche, M. S. Gilmore. Virulence of enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 1994; 7: 462-478
- Schaberg, D. R., M. J. Zervos. Intergenic and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. Antimicrob. Agents Chemother., 1986; 30: 817-822
- Dunny, G. M., B. L. Brown, D. B. Clewell. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*; evidence for a bacterial sex pheromone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978; 75: 3479-3483
- Clewell, D. B., Y. Yagi, G. M. Dunny, et al. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. J. Bacteriol., 1974; 117: 283-289
- Le Blanc, D. L., L. N. Lee. Physical and genetic analysis of streptococcal plasmid pAM β 1 and cloning of its replication region. J. Bacteriol., 1984; 157: 445-453
- Evans, R. P., F. L. Macrina. Streptococcal R plasmid pIP501: endonuclease site map, resistance determinant location, and construction of novel derivatives. J. Bacteriol., 1983; 154: 1347-1355
- Horodniceanu, T., D. Bouanchaud, G. Bieth, et al. R plasmid in *Streptococcus agalactiae* (group

- B). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1976; 10: 795-801
12. Macrina, F. L., G. L. Archer. Conjugation and broad host range plasmids in streptococci, p.313-329. *In* D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, N. Y., 1993
 13. Clewell, D.B. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol. Rev.*, 1981; 45: 409-436
 14. Clewell, D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, 1993; 73: 9-12
 15. Clewell, D. B. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. Plenum Press, New York, 1993; 349-367
 16. Dunny, G.M., B. L. Brown, D. B. Clewell. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*; evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 3479-3483
 17. Dunny, G.M., R.A. Craig, R.L. Carron, et al. Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: production of multiple sex pheromones by recipients. *Plasmid*, 1979; 2: 454-465
 18. Ike, Y. R. C. Craig, B. A. White, et al. Modifuzation of *Streptococcus faecalis* sex pheromone after acquisition of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983; 80: 5369-5373
 19. Christie, P.J., G.M. Dunny. Identification of regions of the *Streptococcus faecalis* plasmid pCF-10 that encode antibiotic resistance and pheromone response functions. *Plasmid*, 1986; 15: 230-241
 20. Fujimoto, S., H. Tomita, E. Wakamatsu, et al. Physical mapping of the conjugative bacteriocin plasmid pPD1 of *Enterococcus faecalis* and identification of the determinant related to the pheromone response. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 5574-5581
 21. Ike, Y., D. B. Clewell. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 8172-8177
 22. Ike, Y., D. B. Clewell, R. A. Segarra, et al. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 155-163
 23. Ike, Y., H. Hashimoto, D. B. Clewell. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1987; 25: 1524-1528
 24. Ozawa, Y., K. Tanimoto, S. Fujimoto, et al. Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (*uvr*) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. *J. Bacteriol.*, 1997; 179: 7468-7475
 25. Tanimoto, K., Y. Ozawa, H. Tomita, et al. Cloning and characterization of the *uvr* (ultraviolet resistance) gene on conjugative plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis*. *Dev. Biol. Stand.* 1995; 85: 83-87
 26. Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, et al. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 3585-3593
 27. Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, et al.

- Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* 1997; 179: 7845-7855
28. Kozue Oana, Yoshiyuki Kawakami, Makoto Ohnishi, et al. Molecular and epidemiological study of the first outbreak of *vanB* type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2001; 54: 17-22
 29. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, et al. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons. Inc., New York. 1987
 30. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989
 31. Evers, S., P. Courvalin. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS_B-VanR_B two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 1302-1309
 32. Kristin, H., G. Simonsen, O. Olsvik, et al. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant *Enterococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:1105-1110
 33. Ike, Y., D. B. Clewell. Genetic analysis of the pAD1 pheromone response *Streptococcus faecalis*, using transposon Tn917 as an insertional mutagen. *J. Bacteriol.* 1984; 158: 777-783
 34. Galli, D., A. Friesenegger, R. Wirth. Transcriptional control of sex pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1-encoded) aggregation substance. *Mol. Microbiol.* 1992; 6: 1297-1308
 35. Hirt, H., R. Wirth, A. Muscholl. Comparative analysis of 18 sex pheromone plasmids from *Enterococcus faecalis*: detection of a new insertion element on pPD1 and implications for the evolution of this plasmid family. *Mol. Gen. Genet.* 1996; 252: 640-647
 36. S. Fujimoto, Don B. Clewell. Regulation of the pAD1 sex pheromone response of *Enterococcus faecalis* by direct interaction between the cAD1 peptide mating signal and the negatively regulating, DNA-binding TraA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 6430-6435
 37. Carol L. Wells, Elizabeth A. Moore, Julie A. Helmut Hirt, et al. Inducible Expression of *Enterococcus faecalis* Aggregation Substance Surface Protein Facilitates Bacterial Internalization by Cultured Enterocytes. *Infection and Immunity*, Dec. 2000; 7190-7194

平成15年度 厚生労働科学研究費補助金（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-ラクタム系薬高度耐性化に関与する調節遺伝子の同定と診断法の研究

分担研究者 井上 松久 北里大学医学部微生物・寄生虫学

研究協力者：岡本了一、中野竜一、兼子謙一

グラム陰性桿菌のセフェム系薬に対する耐性化は、それぞれの菌種の染色体上に普遍的に座位する AmpCβ-ラクタマーゼ遺伝子発現を調節する複数の遺伝子の変異によって調節されていることが明らかとなっている。そこで *E. cloacae* 由来の AmpC をコードする遺伝子セットをクローニングし、これを *E. coli* K12 株に形質転換させ、代表的なセフェム系薬の *in vitro* 選択により耐性変異菌を分離して詳細に調べた。その結果、得られた変異菌は、調べた限り全て *ampD* 変異であり、DNA 塩基配列の結果変異部位は *ampD* の各部位に点在していた。また、IS の挿入変異株も検出された。すべての株で *ampD* 変異に伴って AmpC 量は増加していた。次いで、野生型 *ampD*⁺ および *ampR*⁺ を用いた相補試験を行ったところ、野生型遺伝子は変異型遺伝子 (*ampD*、*ampR*) に対してそれぞれ優性であり、得られた変異株は *ampD* の共存によってセフェム系薬に対する MIC および AmpC 量共に低下した。そこで、セフェム系薬耐性菌の遺伝子変異を特定できることが判ったことから、この方法を用いて臨床分離セフェム系薬耐性 *E. cloacae* について遺伝子変異の特定を行った。その結果、臨床分離の *E. cloacae* では約 90% の株が、*ampD* 変異がセフェム系薬高度耐性化の要因となっていることが判明した。しかし、一部の耐性菌の中には、*ampR* 変異菌も検出された。

感染症の治療に使用可能な抗菌薬は、経口薬および注射薬を含めると約 150 種を数えるが、その中でもペニシリン系薬、セファロsporin系薬およびカルバペネム系薬を含むβ-ラクタム系薬が患者に処方される抗菌薬の60%弱を占めている。腸内細菌科の菌種など多くのグラム陰性桿菌は染

色体上に AmpCβ-ラクタマーゼ産生遺伝子 (*ampC*) および産生調節 *ampR*、*ampD* および *apmG* を保有しているため、β-ラクタム系薬の使い方によってはこれら調節遺伝子の破綻による AmpCβ-ラクタマーゼの多量産生による耐性菌が選択される可能性がある。実際、最近のわが国の疫学調査では、*E.*

cloacae の約 30% がセフトキシムやセフタジジムなどの第三世代セフェム薬に耐性を示すことが知られている。

そこで本研究では、グラム陰性菌におけるセファロスポリン系薬高度耐性菌出現の遺伝学的背景を臨床分離の *E. cloacae* をモデルとして解析するとともにその迅速・簡便診断法について検討した。

1. *E. coli* を用いた AmpC 多量産生菌の作成と耐性に関わる遺伝子の同定

E. cloacae 由来の *ampC-ampR* をクローニングしたプラスミド pKU403 を形質転換させた *E. coli* K12 由来の KU3687 株から ABPC, CEZ, CAZ, CFPM, CZOP, AZT の様々な濃度を用いて耐性菌を選択した。その結果、第四世代セフェム薬の CFPM および CZOP を除く抗菌薬では耐性株が 10^{-4} - 10^{-7} の比較的高頻度に耐性菌が選択され、例えば AZT では MIC の 128 の濃度でも 10^{-7} の頻度で耐性菌が選択された (Table 1)。また、耐性株の選択頻度は選択薬剤濃度に依存していた。選択された耐性株の MIC と産生される AmpC の量を Table 2 に示した。選択薬剤にかかわらず耐性株では AmpC 産生量が元株の KU3687 株に比べて約 70 - 1200 倍に増加しており、産生量に伴って β -ラクタム系薬の MIC も上昇していた。

現在提唱されている AmpC の誘導産生機構モデルによると、細胞壁の構成単位である μ ロペプチドは AmpG を介して細胞内に取り込まれ、AmpD のアミダーゼ活性で分解されて細胞壁合成に再利用される。一方、細

菌が β -ラクタム系薬の影響を受けると、取り込まれる μ ロペプチドの量が増加し、AmpD の処理能力を超える μ ロペプチドが AmpR に結合して AmpC の転写を増加させると考えられている。このモデルから考察すると、AmpC 多量産生株では、1) *ampR* が変異して μ ロペプチドが無くても *ampC* の転写を増強させるようになった場合と 2) *ampD* が変異することによりアミダーゼ活性が低下し、結果的に細胞内の蓄積 μ ロペプチド量が増加した場合とが考えられる。そこで、得られた耐性株の変異がいかなる遺伝子に起因するかを調べるために、まず、耐性株から pKU403 を抽出して *E. coli* K12 株に形質転換させてその酵素活性を調べたところ、元株の KU3687 株と同程度に低い産生量であった。このことから、耐性株の変異は、*ampC-ampR* 以外にあると考えられたので、さらに耐性株の *ampD* について変異の有無を検討した。

E. coli K12 由来の *ampD^r* (野生型) をクローニングしたプラスミド pKU420 を耐性変異株 Mut 1-9 に形質転換させて *ampD^r* の共存株を作成した。次いで *ampD^r* の共存系と非共存系の酵素活性を測定し比較したところ、共存系では AmpC 産生量が約 1/1000 に低下した (Fig. 1)。耐性株の耐性化の原因は *ampD* にあることが予想されたことから、これらの *ampD* の塩基配列を決定したところ、変異株 9 株のうち 6 株では Leu 3 Val、Trp 7 Arg、Trp 7 Gly、Leu 38 Gln、Tyr 130 Asp、Arg 161 Leu と AmpD のアミノ酸置換が認められた。さらに 2 株については IS2

が *ampD* 構造遺伝子内と IS5 が直近の上流に挿入されており、残りの 1 株についてはプロモーター領域に変異が認められた。以上のことから、今回 *in vitro* で得られた耐性株はすべて *ampD* の変異であることが判明

した。さらに、野生型 *ampD* は変異型 *ampD* に対して優勢に働くことが明らかになり、この方法を用いると臨床分離セフェム薬高度耐性菌の耐性遺伝子を特定できる可能性が示された。

Table 1 *E. coli* における耐性変異株の選択率

選択薬剤	元株 KU3687 MIC (μg/ml)	の	選択濃度 (μg/ml)	耐性菌選択頻度
ABPC	32	512	(16 MIC)	$< 1.0 \times 10^{-7}$
		256	(8 MIC)	9.6×10^{-7}
		128	(4 MIC)	4.8×10^{-6}
CEZ	32	512	(16 MIC)	$< 1.0 \times 10^{-7}$
		256	(8 MIC)	4.0×10^{-7}
		128	(4 MIC)	2.6×10^{-6}
CAZ	0.12	2	(16 MIC)	2.4×10^{-7}
		1	(8 MIC)	3.6×10^{-7}
		0.5	(4 MIC)	1.1×10^{-6}
CFPM	0.03	0.5	(16 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
		0.25	(8 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
		0.12	(4 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
CZOP	0.06	0.5	(8 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
		0.25	(4 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
AZT	0.06	8	(128 MIC)	3.4×10^{-7}
		4	(64 MIC)	1.4×10^{-6}
		2	(32 MIC)	1.0×10^{-6}

Table 2 耐性変異株の MIC 及び β -lactamase 活性

菌株	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)							酵素活性 (unit/mg)
	ABPC	CEZ	CTM	CAZ	CFPM	CZOP	AZT	
KU 3687	16	2	0.25	0.12	<0.03	0.06	0.06	0.04
Mut 1	>128	>128	>128	32	0.12	0.25	16	64
Mut 2	>128	>128	>128	64	0.25	0.5	32	44
Mut 3	>128	>128	>128	64	0.25	0.5	32	38
Mut 4	16	>128	16	0.5	<0.03	0.06	0.06	3
Mut 5	>128	>128	32	2	<0.03	0.06	1	12
Mut 6	>128	>128	>128	32	0.12	0.12	32	37
Mut 7	>128	>128	128	16	0.12	0.25	8	56
Mut 8	>128	>128	>128	32	0.12	0.25	32	63
Mut 9	>128	>128	>128	16	0.06	0.12	8	40

CET を基質とした

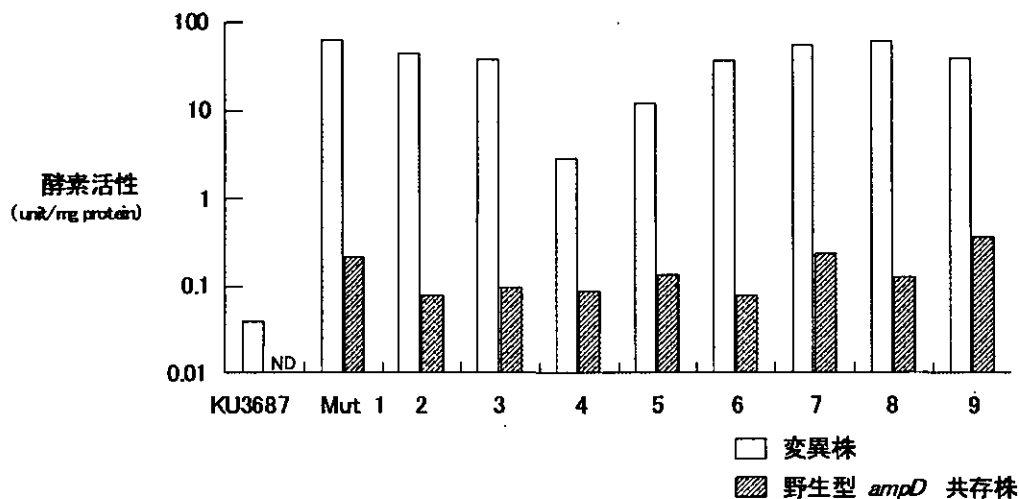


Fig1 変異株に野生型 *ampD* を共存させた時の酵素活性

2. 臨床分離 *E. cloacae* の AmpC 多量産生に関わる遺伝子の同定

北里大学病院をはじめとした数カ所の病

院から分離されたセフトジジム(CAZ)のMICが16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の *E. cloacae* 21株について、CAZ、セフトキシム(CTX)、アスト

レオナム(AZT)、セフェピム(CFPM)、イミペネム(IPM)のMICを測定するとともにAmpCの産生量を測定した。Table 3に臨床分離株の各種 β -ラクタム系薬のMICを示した。No.4, 18, 20以外の株ではCFPMのMICが比較的lowくCAZ, CTX, AZTの耐性化はAmpC多量産生によることが予想された。また、これら3株についてはAmpC以外の酵素産生が疑われた。そこでこれら21株に前項の*E. coli*で行ったと同様に、*E. coli*由来の野生型 *ampD* をもつプラスミド pKU420 を形質導入させて共存系を作成し、その酵素産生量を非共存系の場合と比較した。その結果、臨床分離株の pKU420 非共存系での酵素活性はおおよそ 0.1 30u/mg protein の範囲に分布したが、pKU420 共存系では No.11, 18, 20, 21 株を除くすべての株で酵素産生量は有意に低下した (Fig.2)。すなわち、臨床分離の *E. cloacae* 21株中18株は明らかに *ampD* の変異による AmpC 多量産生がセフェム薬耐性の原因であると推測された。

野生型 *ampD* の共存により酵素産生量が有意に低下しなかった4株についてさらに詳しく調べた結果、No.11株ではPCRによる同定で Toho-1 型の ESBL をしていることが明らかになったが、クラブラン酸(CVA)により酵素活性が完全には阻害されないことか

ら、背景に *ampD* 以外の変異による AmpC の多量産生も疑われた。No.20株ではPCRによる同定でIMP型のカルバペネマーゼを産生していることが明らかになった。No.21株では酵素活性がCVAにより阻害を受けることから class A β -ラクタマーゼを産生していることがわかったが、その種類を同定するには至らなかった。No.18株ではCVAによる阻害反応やPCRによる検索によってもAmpC以外の酵素の産生が否定されたために、*ampD* 以外の変異による AmpC の多量産生が疑われた。そこで、No.11およびNo.18株について *ampR* のPCRシーケンスを行ったところ、いずれの株も *ampR* に変異が認められた。No.11株では86番目のArgがSerに、No.18株では64番目のThrがIleに変異していた。

以上の結果から、臨床分離のセフェム系薬耐性 *E. cloacae* では、約85%が *ampD* の変異による AmpC 多量産生株であることが推測された。また、*ampR* の変異株も約10%程度存在することが示唆された。しかしながら、少数とはいえ臨床分離菌における *ampR* 変異による AmpC 多量産生菌の出現は、染色体性 AmpC β -ラクタマーゼのプラスミド化に大きく関与することが予想されるために注意が必要である。

Table 2 臨床分離 *E. cloacae* に対する β ラクタム系薬の MIC

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	CAZ	GTX	AZT	CFPM	IPM
1	32	64	16	0.5	0.25
2	16	32	8	0.25	1
3	32	64	16	0.5	0.5
4	>128	>128	>128	8	1
5	16	32	8	0.25	0.25
6	128	64	64	2	0.5
7	>128	>128	>128	4	1
8	64	64	16	1	0.25
9	128	128	32	2	0.5
10	128	128	32	2	0.5
11	32	32	8	0.5	0.5
12	16	16	8	0.25	0.5
13	32	32	8	0.5	0.5
14	32	32	8	0.5	0.5
15	64	128	32	1	0.5
16	64	64	32	2	0.25
17	32	64	32	0.5	0.25
18	128	>128	64	8	0.5
19	32	32	32	0.25	0.25
20	>128	>128	64	128	8
21	64	128	32	1	0.25

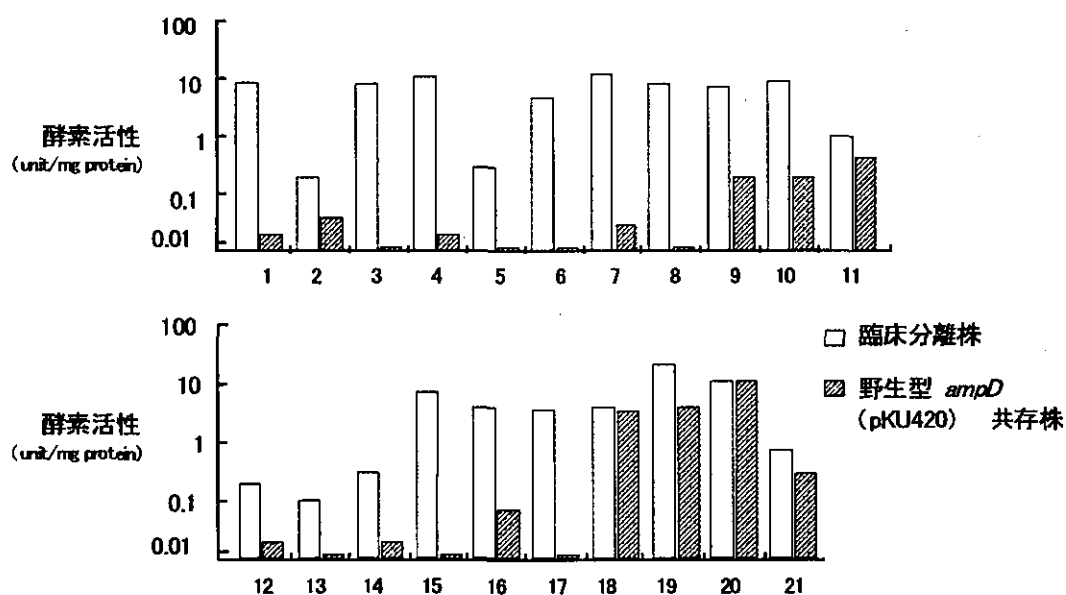


Fig2 臨床分離 *E. cloacae* の β -lactamase 活性

3. プラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼの検索

ヨーロッパを中心にプラスミド性 AmpC β

-ラクタマーゼ産生菌の報告が相次いでいるが、わが国において MOX-1 および CMY-9 が報告されているのみで、未だその報告は

少ない。そこで、*E. coli* および *K. pneumoniae* を標的にセフェム系薬高度耐性菌からプラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼの検索を試みた。

都内の大学病院から分離された *E. coli* KU6400 は、アンピシリン(ABPC)、セファロチン(CET)、セフポドキシム(CPDX)、CTX、AZT、CAZ および CFPM の MIC がそれぞれ >256、>256、>256、64、8、64、0.25 μ g/ml と典型的な AmpC 産生菌の耐性パターンを示した。そこで *E. coli* ML4947 を受容菌として接合伝達したところ、 10^{-5} の頻度でセフェム系薬耐性が伝達された。接合伝達株の酵素産生性を調べたところ、CET を基質として約 10u/mg protein の産生量を示し、基質特性並びに酵素活性が CVA により阻害を受けなかったことから、本プラスミド (pKU601) により産生される酵素は AmpC β -ラクタマーゼが予想された。

そこで pKU601 より β -ラクタマーゼ産生遺伝子をクローニングして塩基配列を解析したところ、そのアミノ酸配列から class C β -ラクタマーゼに特有のモチーフが確認され、しかも *C. freundii* の染色体性 AmpC 産生遺伝子であることが判明したことから、本酵素を CFE-1 と名付けた。さらに興味深いことに、pKU601 は *ampC* 遺伝子の上流に *ampR* 遺伝子を同時に保有していることが明らかになった。*ampR* のシーケンスを行ったところ、135 番目の Asp が Ala に置換されていることが判明した。

通常、グラム陰性桿菌の染色体上の AmpC は *ampD* や *ampR* などの調節遺伝子によって

その産生が調節されるため、産生様式は誘導型であることから、*ampC-ampR* 遺伝子をクローニングしても酵素の産生量は少ない。したがって、染色体上の AmpC 遺伝子がプラスミド化し、十分な形質発現するためには *ampR* の変異など酵素を多量に産生し得る変化が必要となる。今回検出した CFE-1 産生遺伝子では、*C. freundii* の染色体上の遺伝子のうち、まず *ampR* に変異が生じて AmpC が多量に産生されるようになった後にプラスミド化した可能性が示唆される。前項の臨床分離 *E. cloacae* の AmpC 多量産生菌の遺伝背景を調べたところ、約 10% に *ampR* に何らかの変異が認められたことは、AmpC 遺伝子のプラスミド化に繋がる可能性もあるため、かかる菌株の迅速な診断法が必要となる。

研究成果

1. Matsuoka M, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y. Characteristic expression of three genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 220(2): 287-93, 2003.
2. Kaieda S, Okitsu N, Yano H, Hosaka Y, Nakano R, Okamoto R, Takahashi H, Inoue M. Induction of telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 52(4): 736-731, 2003.
3. Nagano N, Sato J, Cordevant C, Nagano

- Y, Taguchi F, Inoue M. Presumed Endocarditis caused by BRO β -lactamase-producing *Moraxella lacunata* in an infant with Fallot's Tetrad. J Clin Microbiol. 41(11): 5310-5312.
4. Inoue M, Lee NY, Hong SW, Lee K, Felmingham D. PROTEKT 1999-2000: a multicentre study of the antibiotic susceptibility of respiratory tract pathogens in Hong Kong, Japan and South Korea. Int J Antimicrob Agents. 23(1): 44-51, 2004.

平成 15 年度分担研究報告書

分担研究課題：呼吸器感染症からの検査材料を用いた直接 PCR による原因菌の迅速検
索法の確立

分担研究者：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）

〔研究要旨〕呼吸器感染症における原因微生物の網羅的検索を目的として，原因菌となる確率の高い6種の微生物に対する PCR 法での同時・迅速診断法の確立をめざした。目的菌は，①肺炎球菌，②インフルエンザ菌，③A 群溶血レンサ球菌，④マイコプラズマ菌(*M.pneumoniae*)，⑤レジオネラ菌(*L.pneumophila*)，⑥クラミジア菌(*C.pneumoniae*)である。新たな方法での結果を得るまでの所要時間は，2～2.5 時間に短縮できた。この方法を小児・呼吸器感染症の検査材料を用いて実施し，培養よりも高い精度であることを証明した。

2.5時間で起炎菌の結果が得られることは，肺炎例等に対し，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，外来症例においては再診時において，抗菌薬の適否も含めて判断できることが明らかにできた。ここで述べた PCR 法の臨床への導入は，患者のみならず，医療経済効果の視点からも，極めて有用であると結論された。

研究協力者：

小林 玲子，諸角 美由紀，長谷川 恵子，千葉
菜穂子，鈴木 悦子(北里大学北里生命科学研
究所，感染情報学研究室)

砂川 慶介(北里大学医学部感染症学講座)

研究目的

呼吸器感染症の起炎菌となる得る頻度の高い
微生物において，さまざまな薬剤に対する耐性化

が急速に進行し，難治例や重症感染症例が多く
なっている。このような背景には，外来患者に
対して，適正とは言えない抗菌薬が細菌検索を施
行することなく empiric に使われていることがひと
つの要因になっていると考えられる。耐性菌の増
加を抑えるには，empiric に行われる化学療法で
はなく，evidence に基づいた化学療法(Evidence
Based Chemotherapy: EBC)を行うことが必要であ
る。結果的にはこの考え方の根付くことが，医療

費抑制にも貢献すると考えた。

そのためには、感染の初期段階に起炎菌となりうる微生物を網羅的に同時検索する手法の確立が必要である。最終的な目標は入院患者に対しては入院当日、外来患者に対しては再診時において抗菌薬使用の是非も含めて最も適切な抗菌薬投与へとスイッチできるようにすることであるが、当面の目標は、2-2.5 時間で主要原因菌を確定できる「呼吸器感染症・起炎菌迅速検索キット」の構築とした。

研究方法

1) 検査材料

平成 14 年 4 月以降、平成 15 年 12 月までの 1 年間に「小児呼吸器感染症研究会(ARD 研究会):代表者 岩田 敏(国立病院東京医療センター・小児科医長)」によって収集された検査材料を対象とした。総計は 1,644 検体となった。

2) 検索用 primer

市中で発症する呼吸器感染症における起炎菌検索の対象としたのは、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③A 群溶血レンサ球菌、④マイコプラズマ (*M.pneumoniae*)、⑤ レジ オ ネ ラ 菌 (*L.pneumophila*)、及び ⑥ クラミジア菌 (*C.pneumoniae*) の 6 種である。

各 primer は主にそれぞれの 16S rRNA 遺伝子上に設計した。設計にあたっては、同一条件で PCR が実行でき、かつ感度も一定に保たれるように工夫した。また、PCR によって増幅される DNA の長さも差をつけて解析しやすいようにした。

それぞれの primer の感度は表1、またその増幅 DNA のサイズは図1に示したとおりである。

チューブあたり 1-7CFU の菌が存在すれば、陽性と判定されている。この成績は、検体採取用の滅菌綿棒の先に 10^3 CFU の目的菌が付着していれば、PCR 陽性と判定される感度である。

3) 小児由来検査材料への応用

前述した網羅的迅速検索用キットの精度を見るために、ARD 研究会によって収集されている検査材料に対して、2)項の primer セットを用いて原因菌の検索を行い、併せて培養による菌検索を実施した。

実際のプロトコールは図2に示したとおりである。

4) 倫理面への配慮

検査材料の収集については、一般細菌検査に替わって施行されているものであるが、症例の倫理面に配慮し、各施設からの材料にはイニシャルのみの記載を依頼した。また、得られた PCR と培養の成績については、担当医へ報告された。

研究結果

1) PCR と培養での成績

1年半に検討したのは 1,644 症例であったが、検体送付時に記載された疾患の内訳を図 3 に示す。肺炎例が最も多く、次いで急性気管支炎、扁桃炎・咽頭炎、急性上気道炎、急性中耳炎であった。

6 菌種 PCR によって陽性と判定された菌について、疾患別に集計した成績を図 4 に示す。肺炎球菌とインフルエンザ菌は、いずれにおいても 40~60%と高い割合で分離されていた。そして、これらの 99.5%は培養によっても菌が証明された。A 群溶血レンサ球菌においては、扁桃炎

などで 10%程度の陽性率であった。一方、マイコプラズマ菌については、下気道感染症となる程高い陽性率になっており、肺炎では検出菌の 20%を越えていた。PCR 陽性の 80%以上で培養陽性であった。クラミジア菌はさまざまな疾患で陽性例がみられたが、対象が6歳以下の小児が多かったためか、陽性率は低かった。

レジオネラ菌は、小児では分離率が低いといわれているが、急性咽頭炎の 1 例のみが陽性で、培養によっても証明できた。

疾患を肺炎例のみに絞ってその成績をみると、肺炎球菌陽性例は 21.2%、インフルエンザ菌が 18.8%、その両菌種の同時陽性例が 17.4%、そして *M. pneumoniae* 陽性例が計 22.4%、*C. pneumoniae* が 1.3 %となっていた。PCR で *M. pneumoniae* 陽性と判定された症例のうち、数例を除いて抗体価の上昇を認め、またこれら陽性例の 80%から培養によって *M. pneumoniae* が分離された。

一般細菌不明例は 18.9%認められたが、この原因菌不明例を減らすためには、ウイルス検査も同時に行っていく必要があると考えられた。

2) PCR への前投薬の影響

抗菌薬が既に使用されている症例に対する PCR の成績について、*M. pneumoniae* での具体例を図 5 に示す。

現実問題として、先生方からお送りいただく検体の半数例には既に抗菌薬が投与されていた。肺炎球菌やインフルエンザ菌では、耐性菌の割合が高いので、経口セフェム薬やマクロライド系薬が使用されていても、多くの場合、菌は

残存していて PCR でも陽性と判定されることが多かった。

しかし、*M. pneumoniae* 等が原因菌の場合には、図にみられるように、本菌に無効なβ-ラクタム薬や前投与なしの場合には 80%以上で PCR 陽性となるが、マクロライド薬やニューキノロン薬が使用されているとその3割程度しか PCR によっても陽性と判定できていなかった。本菌では既に耐性菌が出現し始めているが、一般的には感受性が優れているために1日でもマクロライドが服用されると起炎菌として証明できなくなるということが明らかにされた。

D. 考察 および E. 結論

PCR による迅速診断法は、治療薬選択の上で極めて優れていることは事実である。無菌的な検査材料に使用する際には、特に有用な方法である。

しかし、呼吸器感染症由来の検査材料のように、本来無菌的ではない材料を対象とした際には、PCR 陽性菌＝原因菌と単純には断定できないといった重要な問題を抱えている。

第一に、肺炎球菌やインフルエンザ菌の陽性例において、感染症例と保菌者の区別は可能かどうかということがある。乳幼児例においてはこれらの菌を高い頻度で保菌しているからである。

第二に、「提出された検査材料は適切か否か？」といったことがあげられる。抗菌薬使用前の適切な検査材料が採取されているか否かといったことである。

この問題の解決のためには、単に PCR のみ

を実施するのではなく、炎症所見がみられるか否かということが重要である。小児においては上咽頭ぬぐい液での炎症所見、成人の肺炎例では喀痰の検鏡が必須であると結論された。

化学療法においても empiric ではなく、evidence の基づく chemotherapy が本来の姿である。ここで述べたような起炎菌の網羅的迅速検査が確立されれば、耐性菌の増加を防止でき、また医療コストの面でも有用性が高いと結論された。

そのためには、ウイルスを含めて検索菌種をさらに増やしていくこと、完全自動化できること、薬剤耐性遺伝子も組み込んだシステム構築が必要であろう。これらが確立されてこそ、真の網羅的迅速検査といえる。

F. 研究発表（論文）

1. Hasegawa, K., 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

2. Ubukata, K.: Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. *Journal Infection and Chemotherapy*, 9:285-291, 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 *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学. *日化療誌*, 51:60-70, 2003
4. 諸角 美由紀, 他: *M.pneumoniae* の迅速検索を目的とした PCR —小児呼吸器感染症検体を用いて—. *日化療誌*, 51:289-299, 2003

表1. 構築した6菌種・検索用primerの感度

Microorganism	CFU/tube* (30 μ l)	CFU/lysis tube (35 μ l)	CFU/sample (150 μ l)**
<i>S. pneumoniae</i>	1	18	5.3×10^2
<i>H. influenzae</i>	2	35	1.1×10^3
<i>S. pyogenes</i>	7	123	3.7×10^3
<i>M. pneumoniae</i>	2	35	1.1×10^3
<i>C. pneumoniae</i>	1	18	5.3×10^2
<i>L. pneumophila</i>	7	123	3.7×10^3

*: CFU/reaction tube

** : CFU values are expressed per sterile seed swab collected nasopharyngeal secretions from pediatric outpatients.

図1. 6菌種PCR後の電気泳動成績

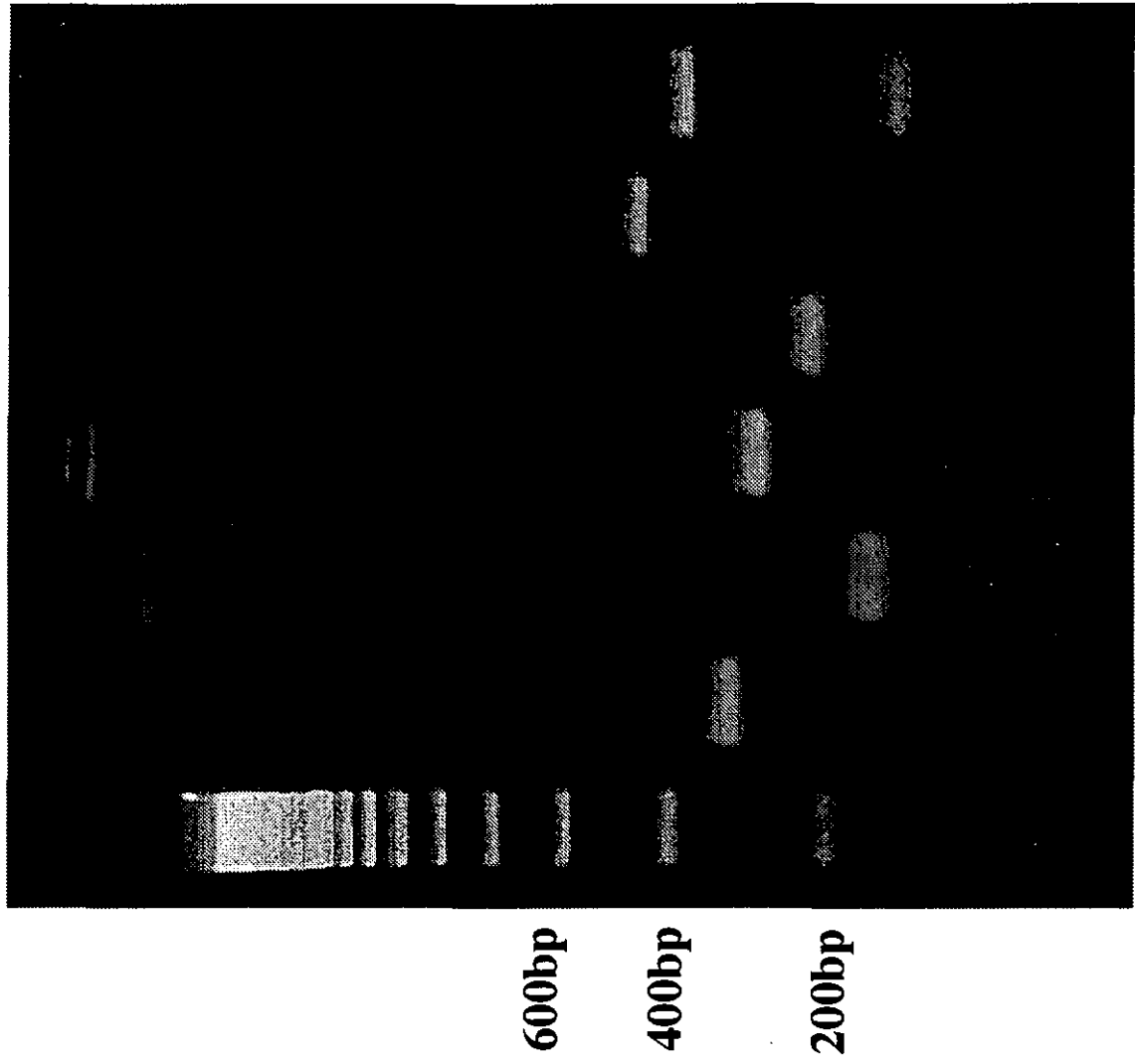


図2. 検査材料を直接用いるPCRプロトコール

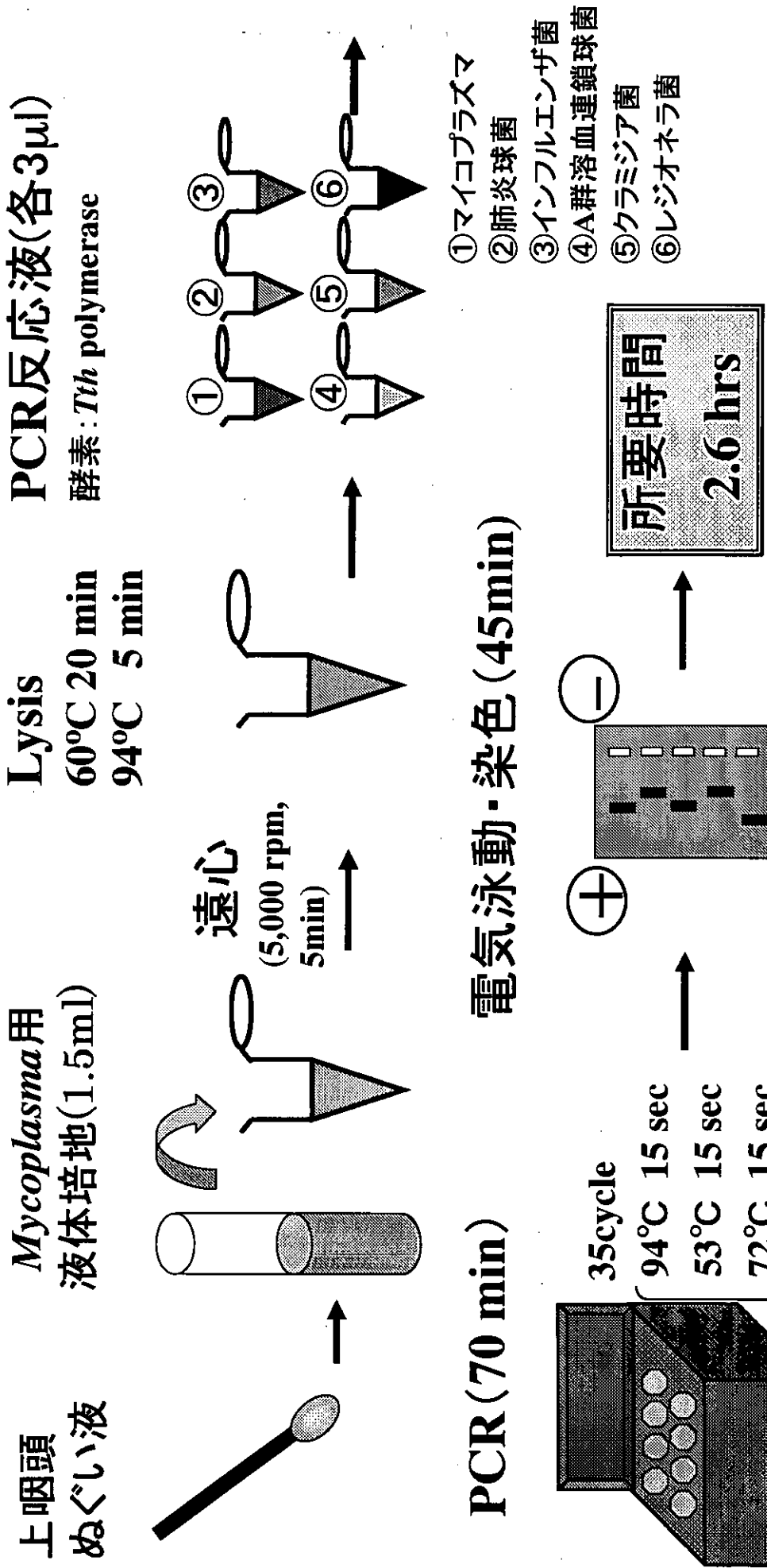


図3. 全症例における疾患の内訳 (n=1,644)

