

Figure 1 PFGE Analysis of XbaI-digested genomic DNA from serovar Typhimurium isolates

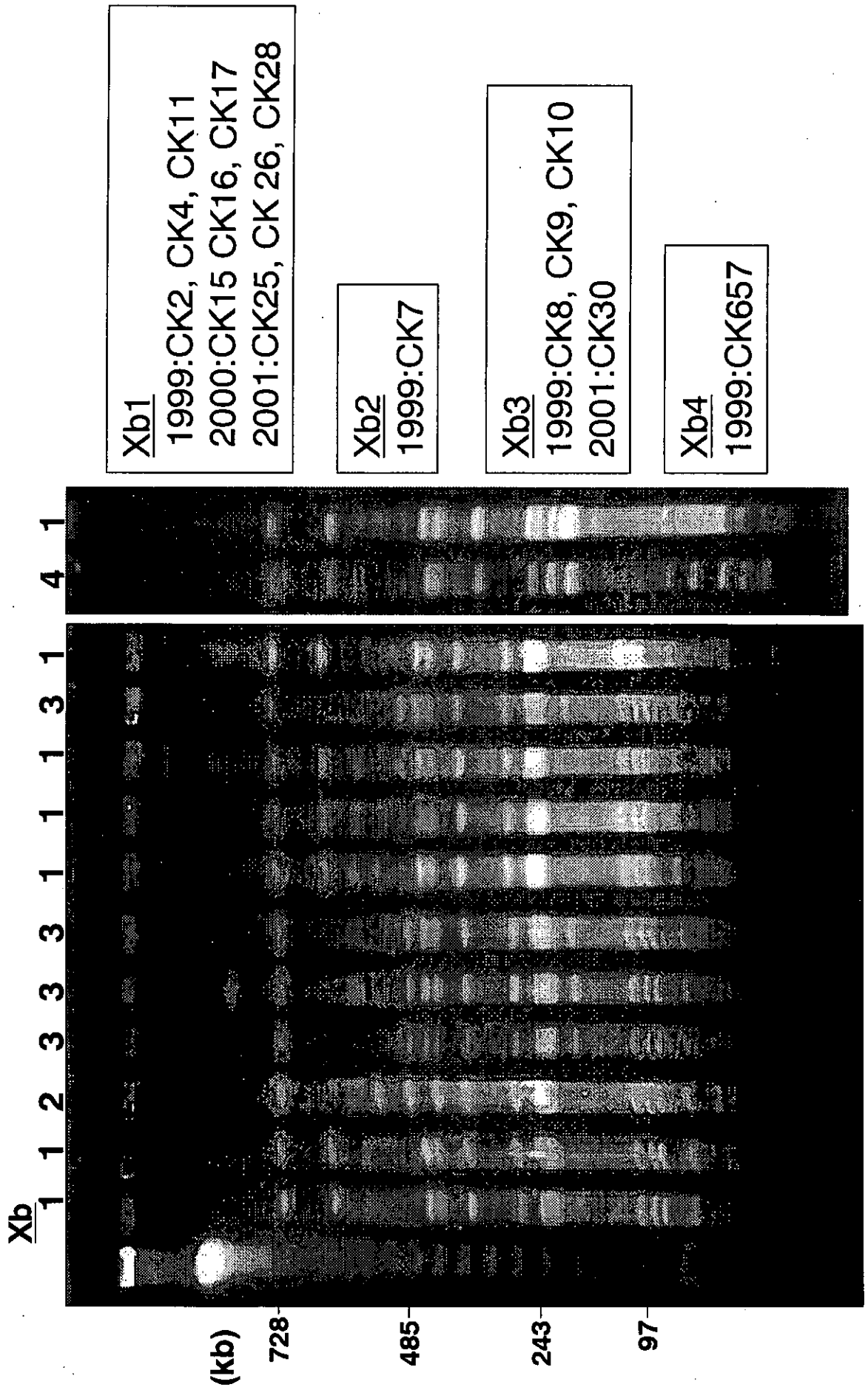
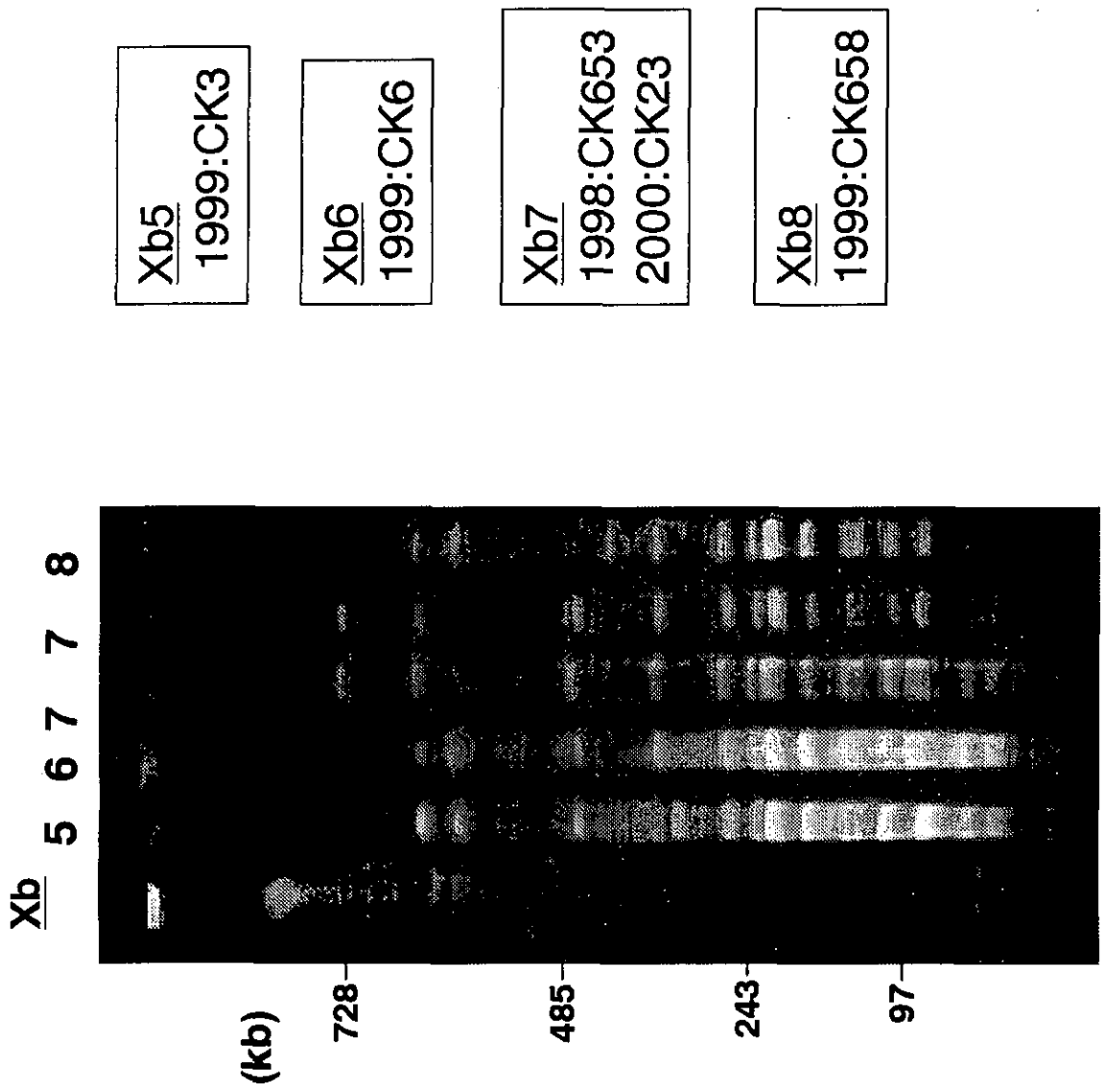


图2 PFGE Analysis of *Xba*I-digested genomic DNA from serovar Typhimurium isolates



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

PCR-RFLP 法を利用したニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌の *gyrA* 変異のスクリーニング法の検討

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌第一部 部長

協力研究者 廣瀬健二 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官

1. 目的

腸チフスは東南アジア、インド大陸、アフリカ、中央アジアなどで、今なお流行を繰り返し、世界中では年間約 2000 万人が感染し、約 70 万人が死亡している。わが国でも昭和初期から終戦直後までは腸チフスが年間約 4 万人、パラチフスが約 5000 人の発生がみられていた。そして、1970 年代までに、環境衛生状態の改善によって年間約 300 例の発生まで減少した。その後さらに減少し、1990 年代に入ってから腸チフス・パラチフスを併せて年間約 100 例程度で推移している。そのほとんどは海外からの輸入事例で、海外旅行が日常化したことによる。現在、腸チフス・パラチフスの治療には、ニューキノロン系抗菌剤が第一選択薬として使われている。ニューキノロン系抗菌剤(LVFX, SPFX, TFLX)を 14 日間経口投与が一般的な腸チフス・パラチフスの治療である。ところが、腸チフスの治療の第一選択薬であるニューキノロン系抗菌剤に耐性または低感受性を示し、治療にニューキノロン系抗菌剤の効果がみられない症例が論文や学会で数多く報告されている。日本にもニューキノロン系抗菌剤に低感受性を示すチフス菌・パラチフス A 菌が、海外からの輸入事例として入ってきている。このような腸チフスではニューキノロン系抗菌剤は無効で他の抗生物質を投与しなければならない。本研究では、速やかに適切な抗生物質の投与が行えるよう、このような低感受性菌を治療開始前にスクリーニングする方法を確立することを目的とする。

2. 方法

本研究では、腸チフス・パラチフスの診断・治療の迅速化に貢献するため、治療という観点から、速やかに効果的な抗生物質の投与が行えるよう、ニューキノロン耐性菌・低感受性菌を治療開始前に PCR 法を用いて迅速にスクリーニングする方法を確立することを目標とする。従来の感受性ディスク法では典型的なニューキノロン耐性菌は検出可能であるが、現在問題となっているニューキノロン低感受性菌は中間もしくは感受性と判定されてしまうため検出が不可能である。現在、ニューキノロン低感受性菌の検出には MIC を測定する以外に方法がない。MIC の測定は複雑な手技を要するため実用的ではない。そのため本研究では MIC 測定より迅速で簡単な PCR 法を用いた検出法の確立を目標にしている。

現在までの研究から感受性株と低感受性株の塩基配列の違いを比較した結果をまとめ、配列のどこに違いがあるかを詳細に検討してある。これらの感受性株と低感受性株の遺伝子の配列の違いは、*gyrA* 遺伝子の 83 番または 87 番に点突然変異が入っていることであった。この点突然変異を PCR-RFLP(Restriction fragment length polymorphism)法を用いて検出で

きる方法を確立し、ニューキノロン低感受性株が検出できるような方法を開発した。まず PCR 法により、*gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅した。その後、PCR 産物の 10 μ l を別のチューブに移し、*HinfI* を加えて 1 時間 37 度におき切断した。その後、15%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で PCR 産物の切断パターンを観察した。

3. 結果

ニューキノロン系抗菌剤に低感受性を示すチフス菌・パラチフス A 菌は *gyrA* 遺伝子に突然変異を持っていることが私たちの現在までの研究で明らかになっている。ニューキノロン低感受性株では、DNA ジャイレースをコードする GyrA の 83 位または 87 位のアミノ酸のいずれかに点突然変異によるアミノ酸置換が起こっていた。ニューキノロン低感受性株のトポイソメラーゼ IV の遺伝子 (*parC*) には点突然変異によるアミノ酸置換は見られなかったため、低感受性菌の感受性の決定は *gyrA* 遺伝子の突然変異の有無によることが考えられた。そこで、私たちは、GyrA の 83 番または 87 番の点突然変異を PCR-RFLP 法によりスクリーニングする方法を開発した。この方法により *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域の DNA 配列決定作業をすることなく迅速に変異の入っている場所を知ることができる。この方法を用いてニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌臨床分離株で変異のパターンを調べたところ、試験したすべての株で変異の入っている場所を特定することができた。また、切断パターンの比較によってニューキノロン耐性株、ニューキノロン低感受性株、ニューキノロン感受性株との区別もすることができた。また、この方法により、ニューキノロン感受性株、低感受性株、耐性株のスクリーニングをわずか 3 時間程度の短時間ですることができた。

4. 考察

ニューキノロン低感受性株の耐性のメカニズムは、ニューキノロン剤の標的酵素である DNA ジャイレースまたはトポイソメラーゼ IV の遺伝子の特定の場所に点変異が入ることにより起こることがすでに報告されている。点変異によるアミノ酸置換が起こることで、ニューキノロン剤の DNA ジャイレースまたはトポイソメラーゼ IV への結合を阻害し、薬剤の効果を低下させている。すべてのニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌では、GyrA の 83 位または 87 位のいずれかにアミノ酸置換が起こっている。さらに、83 位と 87 位の 2 重変異を持つものはさらに高度な耐性を獲得する。本研究では、PCR-RFLP 法で感受性株、低感受性株、耐性株をスクリーニングできる方法を確立することができた。この成果は、腸チフス・パラチフスのニューキノロン低感受性株を迅速にスクリーニングし、治療の開始前の適切な抗生物質の選択に大いに貢献できると考えられる。

5. 研究発表

Hirose, K., Tamura, K., Watanabe, H.

Screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism.

Microbiol. Immunol. 47, 161-165, 2003.

Hirose, K., Itoh, K., Arakawa, E., Tamura, K., Watanabe, H.

DNA based diagnosis method for typhoid fever and paratyphoid fever, and the screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility to fluoroquinolones by PCR- restriction fragment length polymorphism (RFLP). (Review)
Research Advances in MICROBIOLOGY, 2003, vol. 3, p108-117.

Ⅲ. 班會議抄錄

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」 班会議

研究発表プログラム

期日：平成15年11月15日(土) 9:00-15:00

場所：森秋旅館 会議室

住所：群馬県北群馬郡伊香保町 60

TEL：0279-72-2601

PCを用いて発表される演者の方へお願い

1. 各自のパソコンを発表にご使用下さい。
 - パソコンを持参されなかった方、不安のある方は、ご相談下さい。
2. 発表待ち中、発表中に省エネ設定によって画面が消えることがないように設定をお願い致します。
 - Windows XPの場合、コントロールパネル→パフォーマンスとメンテナンスから電源オプションをひらき、《モニターの電源を切る》《システムスタンバイ》などを全て[なし]に設定して下さい。
 - Windows 2000、Me、98の場合、コントロールパネルから電源の設定、電源の管理、電源オプションなどをひらき、《モニターの電源を切る》《システムスタンバイ》などを全て[なし]に設定して下さい。
3. 次演者の方は、前の演者の発表が始まり次第、次演者席におつき下さい。
 - 次演者席の液晶モニターに画面が出ることを確認した後、ケーブルを切り替え器に接続します。この操作中、この後は、発表の終わるまで電源を切らないようお願い致します。次演者席にはAC電源(コンセント)を用意します。発表中も引き続きご利用頂けます。
4. 投影に障害が発生した場合は、大変に恐縮ですが障害の回復にご協力をお願いいたします。

事務局

プログラム

検査・疫学・院内感染 (9:00 - 10:45)

座長 富田治芳 (群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学)

1. メタローβ-ラクタマーゼの蛍光プローブの開発

○黒崎博雅、山口佳宏、後藤正文 (熊本大大学院医学薬学研究部)

2. 肺炎例からの検査材料を用いた PCR 法による *Mycoplasma pneumoniae* の迅速診断の有用性と検出菌の薬剤感受性

諸角美由紀、生方公子、ARD 研究会 (北里大学大学院・感染制御科学府)

3. 化膿性髄膜炎例から分離された *Streptococcus pneumoniae* の耐性遺伝子解析

— 1993 年から 2002 年の分離株について —

千葉 菜穂子、長谷川 恵子、砂川 慶介、生方 公子、「化膿性髄膜炎・全国サーベイランス研究班」(北里大学大学院・感染制御科学府)

4. 化膿性髄膜炎例より分離された *Haemophilus influenzae* の遺伝子解析

長谷川 恵子、生方 公子、砂川 慶介、「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究班」(北里大学大学院・感染制御科学府)

5. 日本国内におけるチフス菌・パラチフス A 菌の分離状況

廣瀬健二、渡邊治雄 (国立感染症研究所 細菌第一部)

座長 和田昭仁 (国立感染症研究所 細菌第一部)

6. 院内感染アウトブレイク時における対応

鈴木里和^{1,2}、吉田英樹²、砂川富正³、大山卓昭³、谷口清州³、岡部信彦³、蒲地一成¹、荒川宜親¹ (¹国立感染症研究所 細菌第二部、²国立感染症研究所 実地疫学専門家養成コース、³国立感染症研究所 感染症情報センター)

7. ヒト由来多剤耐性 *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* の分子疫学

高屋明子¹、友安俊文¹、小関千愛¹、内村眞佐子²、依田清江²、○山本友子¹
(¹千葉大・院薬・微生物薬品化学、²千葉県衛研)

*** コーヒーブレイク (10:45 - 11:00) ***

グラム陰性菌 (11:00 - 11:30)

8. 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 MexAB-OprM および MexXY-OprM の重要性と検出法考案についての試み

後藤 直正、隈下麻美、門野愛美、尾崎 徹、村田 健、西野 武志 (京都薬大・微生物)

9. 同一患者より分離された *Helicobacter pylori* におけるクラリスロマイシン耐性株、感性株の遺伝学的関連性の解析

金井京子^{1,2}、柴山恵吾¹、荒川宜親¹

(¹国立感染症研究所・細菌第二部、²東京理科大学大学院・薬学研究科)

グラム陽性菌およびアミノ糖耐性 (11:30 - 12:30)

座長 柴田尚宏 (国立感染症研究所 細菌第二部)

10. 16S rRNA メチレーズ遺伝子保有株の分離方法とその保有状況について

山根一和、和知野純一、土井洋平、八木哲也、柴田尚宏、柴山恵吾、加藤はる、荒川宜親

(国立感染症研究所 細菌第二部)

11. MRSA におけるアミノグリコシド耐性菌の動向予測 1) -コロニーダイレクト PCR によるキー遺伝子の迅速検出と分布動向

土崎尚史、石野敬子、石川淳、堀田国元 (国立感染症研究所生物活性物質部)

12. MRSA におけるアミノグリコシド耐性菌の動向予測 3) -aac(6')/aph(2") 保持 MRSA に対するアミノグリコシド抗生物質の抗菌活性と変異型 aac(6')/aph(2") の解析

石野敬子、土崎尚史、石川淳、堀田国元 (国立感染症研究所生物活性物質部)

13. VanD 型バンコマイシン耐性 *Enterococcus raffinosus*

○野村隆浩¹、谷本弘一²、小澤良之¹、丸山英行³、荒川宜親⁴、池 康嘉^{1,2}

(¹群馬大院・医・細菌感染制御、²群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設、

³済生会習志野病院・細菌検査、⁴国立感染研・細菌第二部)

***** 昼食 (12:30 - 13:30) *****

β -lactamase (13:30 - 15:00)

座長 堀田国元 (国立感染症研究所生物活性物質部)

14. *Klebsiella pneumoniae* より同定されたセファマイシン分解性・阻害剤抵抗性を有する GES 型 class A

β-ラクタマーゼの解析

○和知野 純一^{1,2}、土井洋平¹、山根一和¹、柴田尚宏¹、八木哲也¹、甲斐久美子¹、
荒川宜親¹ (¹国立感染症研究所 細菌第二部、²名古屋大学大学院医学系研究科)

15. *Citrobacter freundii* 由来プラスミド性 AmpC β-lactamase の解析

○中野竜一、兼子謙一、須田和美、岡本了一、井上松久
(北里大学大学院医療系研究科環境感染学)

16. Class C β-lactamase を多量産生する臨床分離 *Enterobacter cloacae* の遺伝子解析

○兼子謙一、中野竜一、中野百実子、須田和美、岡本了一、井上松久
(北里大学大学院医療系研究科環境感染学)

17. グラム陰性桿菌における CTX-M-型β-ラクタマーゼの型別とインテグラーゼ遺伝子保有状況の調査

柴田尚宏、山根一和、土井洋平、和知野純一、八木哲也、黒川博史、荒川宜親
(国立感染症研究所 細菌第二部)

18. CTX-M-2 型 β-ラクタマーゼ産生性 *Proteus mirabilis* 感染症の院内流行

○長野由紀子¹、斉藤優子¹、長野則之¹、柴田尚宏²、荒川宜親²
(¹船橋市立医療センター 検査科微生物、²国立感染症研究所 細菌第二部)

メタロ-β-ラクタマーゼの蛍光プローブの開発

(熊本大学院医学薬学研究部) ○黒崎博雅, 山口佳宏, 後藤正文

【序論】メタロ-β-ラクタマーゼはカルバペネムを含む幅広いβ-ラクタム剤を加水分解しかつ临床上用いることのできる阻害剤に感受性がなく、これを産生する病原菌の蔓延が危惧されている。そのため感染菌のメタロ-β-ラクタマーゼ産生の有無を確認することは初期段階での治療において極めて重要である。メタロ-β-ラクタマーゼの活性中心には複核の亜鉛が存在する。我々はこの亜鉛イオンと特異的に結合するチオール基と蛍光色素 (ダンシル基) を含む DansylCnSH (n=2-6) を合成し(図1)、蛍光法によるメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の検出法を検討した。

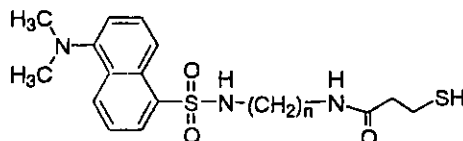


Fig.1. Structure of DansylCnSH (n=2-6)

【実験】1 μM の DansylCnSH (n=2-6) と等モルの IMP-1 を混合し蛍光スペクトルを測定した。次に、1 μM の DansylCnSH (n=2-6) 溶液に IMP-1 溶液を段階的に適宜加え、同様に蛍光強度を測定し解離定数 K_d 値を求めた。また、基質をニトロセフィンとして DansylCnSH (n=2-6) による IMP-1 活性阻害を測定し拮抗阻害の回帰曲線にあてはめ阻害定数 K_i 値を求めた。

【結果・考察】図2に一例として DansylC2SH の IMP-1 非存在下および存在下での蛍光スペクトルを示す。340 nm で励起させると DansylCnSH (n=2-6) は 540 nm で発光し、これに IMP-1 を徐々に加えていくと蛍光強度は増大しかつ蛍光強度ピークは 525 nm にシフトした。IMP-1 との解離定数 K_d は 356 nM (n=2), 975 nM (n=3), 67 nM (n=4), 154 nM (n=5), 105 nM (n=6) となり、阻害定数 K_i は 1100 nM (n=2), 1300 nM (n=3), 140 nM (n=4), 280 nM (n=5), 160 nM (n=6) となり、 K_d と K_i の値はほぼ一致した。

同一条件下、1 μM の DansylCnSH (n=2-6) にアルブミンまたは活性中心に亜鉛 1 個を含むカーボニックアンヒドラーゼを添加しても蛍光強度の増大は観測されなかった。

DansylCnSH (n=2-6) はメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的に結合し、タンパク質側鎖との相互作用により蛍光が増大することが示された。

さらに、DansylC4SH と IMP-1 との複合体の結晶化と X 線結晶構造解析に成功したので X 線結晶構造も報告する。

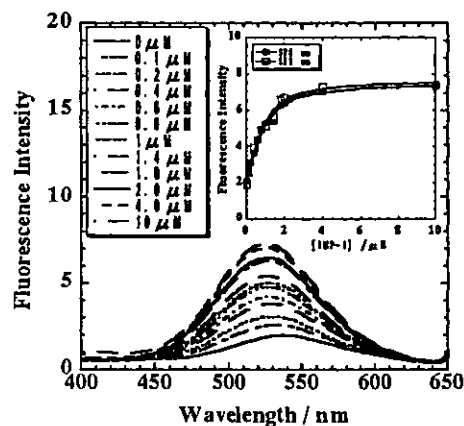


Fig.2. Fluorescence spectral changes of DansylC2SH (1 μM) on addition of metallo-β-lactamase (IMP-1) in 50 mM Tris Buffer (pH 7.4, 0.5M NaCl, 10%MeOH) at 25 °C and plot of Fluorescent Intensities at 538 nm and 522 nm vs. [IMP-1].

表題：肺炎例からの検査材料を用いたPCR法による*Mycoplasma pneumoniae*の
迅速診断の有用性と検出菌の薬剤感受性

北里大学大学院・感染制御科学府 諸角美由紀，生方公子，ARD 研究会

[目的]

M. pneumoniae は原発性異型肺炎の起炎菌として知られる。本菌は一般細菌が有する細胞壁を有しておらず、培養の難しい菌のひとつであることから培養がほとんど行われなくなっている。このような培養に時間を要する微生物に対する PCR 法が注目されている。当研究室では、呼吸器感染症の主要な起炎菌である肺炎球菌やインフルエンザ菌と同時に、培養困難なこのような微生物をも PCR 法によって検索するシステムの構築を検討している。この発表においては、それらの成績の中から肺炎例を対象とした *M. pneumoniae* に対する PCR および培養による成績と、その臨床所見にみられる特徴、症例の年齢分布、薬剤感受性と耐性菌の出現について報告する。

[方法]

肺炎と診断された小児例(n=369)より採取された上咽頭ぬぐい液は、PPLO液体培地中へ十分に混釈し、5,000 rpm, 5 minの遠心を行った。上清部分を捨て去り、沈渣50.1として均一化した後、その5.1を溶菌用に用いた。次いで、2.1の溶菌液をPCR反応液(30.1)へ加えてPCRを実行した。PCRは94°C:15sec, 53°C:15sec, 72°C:15secの条件で35サイクル実行した。PCR用primerは16S rRNAの配列に基づき設計した。検査材料の処理から結果を得るまでの所要時間は約2.6時間である。培養による菌検索は定法に従った。培養できた*M. pneumoniae*のマクロライド薬とニューキノロン薬に対する感受性を測定し、耐性が疑われた菌株は遺伝子解析を行った。

[結果・考察]

肺炎369症例のうち68例(18.4%)がPCRによって*M. pneumoniae*陽性と判定された。抗体価測定が実施された57例のうち、1例を除いたすべての症例において抗体価は有意に上昇していた。一方、PCRでは陰性であったが、抗体価測定によって上昇が確認された症例が20例(5.4%)認められたが、それらの症例には*M. pneumoniae*に有効なマクロライド系薬が数日間投与された後に検体採取が行われた例が多かった。

M. pneumoniae のマクロライド系薬に対する感受性 (MIC₉₀)は、EM:0.0156 . g/ml, CAM:0.0156 . g/ml, AZM:0.000975 . g/mlと優れ、このようなマクロライド系薬が1日でも投与されると、PCRによる検索は陰性となることが判明した。

MIC測定を実施した株の中にマクロライド系薬耐性と推定された株が2株認められた。EM, CAM, AZMのMICはすべて16 . g/mlで、本来の感性菌が示す感受性よりも1,000倍以上MICが低下していた。この耐性菌は23S rRNAドメインVの2063番目のadenineがguanineに変異していた。LVFXのMIC₉₀は1 . g/mlで耐性菌は認められなかった。

症例における臨床所見の特徴を解析すると、*M. pneumoniae* 陽性例のWBC値、CRP値、および年齢分布は、肺炎球菌やインフルエンザ菌が起炎菌とされた肺炎例とは明らかに異なっていた。菌検索に*M. pneumoniae*のPCR法を加えることは、呼吸器感染症の起炎菌を推定する上で極めて有用であり、さらには治療薬の選択に際しても有益であると結論された。

表 題：化膿性髄膜炎例から分離された*Streptococcus pneumoniae* のβ-lactam薬耐性遺伝子解析
1993年から2002年の分離株について

北里大学大学院・感染制御科学府 千葉 菜穂子, 長谷川 恵子, 砂川 慶介, 生方 公子
「化膿性髄膜炎・全国サーベイランス研究班」

[目的]

耐性肺炎球菌, すなわち PISP, PRSP による重症呼吸器感染症や化膿性髄膜炎の増加は世界的にも問題となっている。私達は本邦におけるそれら耐性菌の疫学調査を行い, 適切な初期治療薬の選択と迅速診断確立のために, 「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究班」を組織し, 研究活動を行っている。今回は今までに収集された菌株に対する注射薬感受性, 耐性遺伝子解析, 病原性に関わりのある莢膜血清型について報告する。

[方法]

1993年から2002年の10年間に化膿性髄膜炎例から分離された肺炎球菌286株と, 髄液のPCRを直接実施し, 起炎菌が肺炎球菌であると診断された18例の合計304例を解析対象とした。各施設からの菌株の収集とその解析結果の報告は, 共同研究者が述べたとおりである。被験菌株に対する薬剤感受性は寒天平板希釈法によって実施し, ペニシリン結合蛋白(PBPs)の遺伝子変異の有無はPCRにて検索, 血清型別は型別用抗血清(Statens Serum Institute, Denmark)を用いて莢膜膨化試験によってサブタイプまで判定した。

[結果・考察]

PCRによる*pbp1a*, *pbp2x*, および*pbp2b* 遺伝子変異とPCGに対する感受性から, 被験菌は, (i) 3遺伝子に変異を持たないPSSP(23.1%, MIC₉₀:0.031 μg/mL), (ii) *pbp2x* 単独変異(19.9%, 0.063 μg/mL), (iii) *pbp2b* 単独変異(0.7%, 0.125 μg/mL), (iv) *pbp2x+2b* 変異(5.9%, 0.25 μg/mL), (v) *pbp1a+2x* 変異(10.5%, 0.25 μg/mL), (vi) 3遺伝子に変異を認める株のPRSP(39.9%, 2 μg/mL)に識別された。(ii)~(v)の株はPISPとした。過去3年間の分離株とそれ以前の株とを比較すると, *pbp2x* 変異株の割合は有意に上昇していた。PRSPによる発症率は, 成人(27.1%)に比べ, 小児(45.3%)において明らかに高かった。

PRSPに対する各薬剤の抗菌力(MIC₉₀)はPAPM(0.125 μg/mL) > BIPM(0.25 μg/mL) > MEPM=VCM(0.5 μg/mL) > CTX(1 μg/mL) > CTRX(2 μg/mL) > ABPC(4 μg/mL) > CTM(8 μg/mL)の順に優れていた。なお, 過去3年間に分離されたPRSPの中には, PCGやCTXに大多数のPRSPが示すMICよりもさらにMICの高い株がわずかながら認められた。

小児由来株の血清型は, 6B(25.4%), 19F(19.0%), 23F(13.8%), 6A(10.1%), および14型(7.9%)が多く, PRSPはこれらの血清型に優位であった。一方, 成人由来株では23F(16.5%), 22(12.4%), 3(11.3%), 6B(10.3%), 19F(9.3%) および10と14型(6.2%)が多く, 小児株との間に有意な差が認められた(p=0.0000 (**))。

耐性度の高いPRSPの出現は, 重症呼吸器感染症や髄膜炎の治療に際してさらに難渋することも予測される。分子レベルでの正確なサーベイランスの継続が求められている。

表題：化膿性髄膜炎例より分離された*Haemophilus influenzae*の遺伝子解析

北里大学大学院・感染制御科学府 長谷川 恵子, 生方 公子, 砂川 慶介,
「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究班」

[目的]

小児化膿性髄膜炎例における原因菌の50%は*H. influenzae* type b (Hib)である。近年、本菌の中にBLNAR (β -lactamase-nonproducing ampicillin (ABPC)-resistant *H. influenzae*)と呼ばれる耐性菌が急速に増加している。BLNARにおける耐性機構は、 β -lactam系薬の作用標的である細胞壁合成酵素のうち、隔壁合成に関わるPBP3をコードする*ftsI*遺伝子上に変異が生じたものである。化膿性髄膜炎由来株のうち、BLNARとBLPACR (β -lactamaseと*ftsI*変異を同時に保持する株)について、*ftsI*遺伝子を解析すると同時に、PFGEを実施し、本邦における化膿性髄膜炎由来株の分子レベルでの疫学解析を行った。それらについて報告する。

[方法]

対象とした*H. influenzae*菌は、1999年1月から2002年12月末までの4年間に「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究」に参加する全国226医療機関の細菌検査室を通じ担当医了解の元に分離と同時に送付を受けた395株である。これらの菌株には到着後ただちにPCRによる耐性遺伝子解析がなされ、検査室で参考データとして各施設へ返却された。また、BLNARの*ftsI*遺伝子の塩基解析を行った。PFGE解析は定法に従い*Sma*I酵素を用いて実行した。

[結果・考察]

395株の*H. influenzae*菌内訳は、PCRによる遺伝子解析では感性菌が115株、TEM-1型 β -lactamase産生菌が61株、軽度耐性BLNAR (Low-BLNAR)が121株、BLNARが55株、BLPACR Iが36株、およびBLPACR IIが7株であった。

55株のBLNARに対する*ftsI*遺伝子の解析結果は、Asn₅₂₆ Lysへの置換と、保存性アミノ酸配列Ser-Ser-Asn周囲にみられるMet₃₇₇ Ile, Ser₃₈₅ Thr および Leu₃₈₉ Pheを有する株が35株と最も多かった。次いで、Arg₅₁₇ HisとSer₃₈₅ Thrの2ヶ所のアミノ酸置換を有する株が9株認められた。その他の異なるタイプのアミノ酸置換も認められ、変異のタイプ別に分類すると、6つのサブグループに識別された。耐性菌に対する注射薬の感受性は、ABPCが1~8 g/ml, CTXが0.25~2 g/ml, MEPMが0.125~0.5 g/mlであった。耐性レベルは保存性アミノ酸配列(SSN)の周囲にアミノ酸置換が挿入されるほど上昇すると考えられた。

PFGEの成績では、BLNAR, BLPACR IIも含めて、極めてhomologousなPFGEパターンを示した。同時期に肺炎例から分離されたBLNARは、多様なPFGEパターンを示していた。上述した成績は、同一クローンのHib-BLNARが薬剤の選択圧を受け変異を繰り返しながら全国へ拡散しつつあることを示唆している。

このような耐性菌の増加は、適切な治療方法の確立と共に、Hibワクチンの早期実施、および継続的な分子疫学研究が必要であることを示している。

日本国内におけるチフス菌・パラチフス A 菌の分離状況

廣瀬健二、渡邊治雄（国立感染症研究所 細菌第一部）

腸チフス・パラチフスは、日本を除く東アジア、東南アジア、インド亜大陸、中東、東欧、中南米、アフリカなどに蔓延し、現在もお流行を繰り返している。わが国でも昭和初期から終戦直後までは腸チフスが年間約4万人、パラチフスが約5000人の発生がみられていた。そして、1970年代までに、環境衛生状態の改善によって年間約300例の発生まで減少した。その後さらに減少し、1990年代に入ってから腸チフス・パラチフスを併せて年間約100例程度で推移している。そのほとんどは海外からの輸入事例で、海外旅行が日常化したことによる。腸チフス・パラチフスの集団発生は、1990年代になっても発生があり、1993年に首都圏で50名の腸チフス患者、1994年には近畿地方で34名のパラチフス患者、1998年には関東地方で約20名のパラチフス患者がみられている。

2000年代に入ってから年間腸チフス約60例、パラチフス30例ほどの発生が見られている。

チフス菌・パラチフス A 菌の海外からの輸入事例から薬剤耐性菌が分離されている。チフス菌では、日本国内事例からは薬剤耐性菌はほとんど分離されていないが、インド亜大陸、タイへの渡航者からアンピシリン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン(TC)、ストレプトマイシン(SM)、ST合剤(ST)の5剤に耐性を持つ多剤耐性チフス菌が分離されている。パラチフス A 菌においては多剤耐性菌はほとんどみられないものの、CP、SM、STなどの1つの薬剤に耐性の株が増加してきている。腸チフス、パラチフスには抗菌剤の投与による治療が行われる。現在ではニューキノロン系抗菌剤が第一選択薬として使われている。ニューキノロン剤(LVFX, SPFX, TFLX)を14日間経口投与が一般的な腸チフス・パラチフスの治療である。ところが、腸チフスの治療の第一選択薬であるニューキノロン系抗菌剤のシプロフロキサシン(Ciprofloxacin)に耐性または低感受性を示す株の存在が数多く報告されている。日本にもニューキノロン系抗菌剤に低感受性を持つチフス菌・パラチフス A 菌が、海外からの輸入事例として入ってきている。これらは NCCLS のブレイクポイントから判定すると、ニューキノロン系抗菌剤に耐性ではない。しかし、ニューキノロン系抗菌剤に対する MIC が感性株の約10倍またはそれ以上高い。また、ナリジクス酸に耐性で、第3世代セフェム系抗菌剤には感受性である。ニューキノロン低感受性菌による腸チフス・パラチフスでは、ニューキノロン系抗菌剤による治療には反応せず、速やかに解熱しない。現在までにニューキノロン系抗菌剤による治療が奏功しなかった腸チフス・パラチフスの症例も多く報告されている。ニューキノロン系抗菌剤の効果が望めない症例では第3世代セフェム系抗菌剤(CTX, CTRXなど)が使用される。現在のところ、第3世代セフェム系抗菌剤に耐性をもつチフス菌・パラチフス A 菌は報告されていない。このようなニューキノロン低感受性菌は1998年より急激に増加している。2000年では、日本で分離されるチフス菌の36%、パラチフス A 菌の31%が、2001年では、チフス菌の25%、パラチフス A 菌の43%がニューキノロン低感受性菌であった。今後、腸チフスの治療には直ちにニューキノロン系抗菌剤を投与するのではなく、分離菌株の薬剤感受性試験を行ってから治療を始める姿勢が必要となってきている。低感受性菌がさらに高度な耐性を獲得し完全な耐性菌となるとニューキノロン剤は無効となる。このような耐性菌が現れるのは時間の問題であり、引き続き腸チフス・パラチフスの発生の動向を監視する必要があるだろう。

院内感染アウトブレイク時における対応

鈴木里和¹⁾²⁾、吉田英樹²⁾、砂川富正³⁾、大山卓昭³⁾、谷口清州³⁾、岡部信彦³⁾
蒲地一成¹⁾、荒川宜親¹⁾

- 1) 国立感染症研究所 細菌第二部
- 2) 国立感染症研究所 実地疫学専門家養成コース
- 3) 国立感染症研究所 感染症情報センター

感染症アウトブレイク時は、対策（介入）と疫学調査の2本柱での対応がとられる。また対策は、アウトブレイクを確認したと同時に実施されるものと、疫学調査の結果を踏まえた将来的な予防策に分けられる。

院内感染のアウトブレイクの発生を把握した直後には、まずはそれ以上の症例の発生を防止するためにその時点で考えられる原因への迅速な対策が必要である。これには標準予防策の徹底といったものから、場合によっては新規入院や手術の延期、病棟の一時的な閉鎖などが考えられる。その後、疫学調査による感染源や感染経路の解明に伴って有効かつ長期的に実行可能な将来的予防策が実施されることが望ましい。

院内感染のアウトブレイク調査では医療記録の閲覧、医療スタッフに対する聞き取り調査、入院患者の保菌状況や環境調査といった細菌学的検査が主要な情報となる。医療記録はしばしば膨大な情報を含んでいるため、過去の事例や菌の性質などを考慮し効率的に情報を収集する必要がある。また耐性菌の院内感染では細菌学的検査の結果が非常に重要であるため、アウトブレイクの把握後は可及的速やかに検体の確保に努めることも調査上の留意点である。これらの情報を系統立てて記述し、感染源・感染経路や危険因子に関する仮説を策定したのち、コホート研究、症例対照研究といった解析疫学的手法および細菌学的検査による分子疫学的手法で仮説を検証する。最終的には感染源・感染経路の特定とそれを踏まえた提言の作成をもって疫学調査終了とする。

院内感染の疫学（Hospital Epidemiology）には医療制度や医療に対する文化が関わっており国によってさまざまな特徴がある。疫学が異なれば感染対策も異なってくるため、海外の院内感染対策を直輸入してもわが国の現状にそぐわないこともありうる。今後わが国において、より有効かつ実践的な院内感染対策を講じるためには、海外のデータを有効に利用しながらも、サーベイランスとアウトブレイク時の疫学調査によってわが国独自の薬剤耐性菌の疫学を明らかにし、根拠をもって実践的な院内感染対策を提言していくことが必要と思われる。

ヒト由来多剤耐性 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium の分子疫学

高屋明子¹・友安俊文¹・小関千愛¹・内村眞佐子²・依田清江²・○山本友子¹

¹千葉大・院薬・微生物薬品化学、²千葉県衛研

S. enterica serovar Typhimurium (ST)は、serovar Enteritidis (SE)と同様に国内外を問わず食中毒の原因菌として最も重要なものの一つである。欧米では90年代に入ってから多剤耐性のST特にDT104が急激に増加して大きな問題となっているが、我が国でも近年、ヒトや家畜において多剤耐性DT104の増加が報告されている(Tamada et al., 2001 J. Clin. Microbiol. 39:1057, Izumiya et al., 2001 J. Clin. Microbiol. 39:2700)。多剤耐性DT104の特徴は、複数の耐性遺伝子が染色体上の*Salmonella* Genomic Island (SGI)₁と名付けられた領域にクラスターをなして存在することである。世界各地で分離されたDT104のmajorityはSGI₁を有しているが、さらなる耐性遺伝子の付加やSGI₁の再配列等によって構築されたと考えられるvariantも多数分離されていることから、疫学調査に加え、SGI₁の起源と進化、新たなSGIの存在、さらにSGIの水平伝搬の可能性とメカニズム等に関する分子生物学的研究が必要であると考えられる。

今回我々は、1999年から2002年に千葉県下で発生した食中毒散発事例より分離されたST37株を対象に分子疫学的解析を行った。37株中23株が多剤耐性DT104にみられるAmpicillin (Ap), Streptomycin (Sm), Sulfonamide (Su), Chloramphenicol (Cm), Tetracycline (Tc)耐性を有し、さらに、Kanamycin, Trimethoprim, Nalidixic acid (Nx)耐性が加わったものが存在した。又、Cm, Sm, Su および Sm, Su 耐性株がそれぞれ1株存在した。全塩基配列が公開されたDT104 strain 96-5227の耐性遺伝子(MDR)領域は、2つのclass I インテグロンすなわち *IntI1-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1*と *intI1A-pseI-qacEΔ1-sul*により挟まれて構築されている。この構造を参考にして上記Ap, Sm, Su, Cm, Tc耐性23株について、β-lactamase Typing, PCR Mapping, Southern Hybridization, PFGEを行い以下のことを明らかにした。15株がPSE1 type, 5株がOXA1 type, 3株がTEM typeのβ-lactamaseをコードしていた。PSE1 typeのうち14株が2個のインテグロンを有し、MDRはstrain 96-5227と同様の構造であると考えられたが、PFGE patternは5タイプに分かれた。1株は2個の*intI1*を有していたがMDR領域の構造は異なっていた。OXA1 typeは、すべてが*intI1-oxa1-aadA1*のインテグロンを有していたが、PFGE patternは4タイプに分かれた。*intI1-oxa1-aadA1*によるMDR構築の可能性を検討中である。

同時期に分離されたSE68株の薬剤耐性を検討したところ、Tc耐性1株、Nx耐性1株、Sm耐性45株であり、現在の所SEでの多剤耐性化は進んでいないと考えられた。

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 MexAB-OprM および MexXY-OprM の重要性と検出法考案についての試み

京都薬大・微生物 後藤 直正、隈下麻美、門野愛美、尾崎 徹、村田 健、西野 武志

【はじめに】 緑膿菌の染色体上のポリシストン性の遺伝子群にコードされたマルチコンポーネント型排出システムが、本菌の抗菌薬耐性、さらには多剤交差耐性の一因として機能していることが知られてきた。PAO1 株のゲノム配列プロジェクトの成果は、計 12 種類のマルチコンポーネント型排出システム遺伝子群の存在を示唆した。これらの多剤排出システムのうち、MexAB-OprM は野生株でも発現し、アミノ配糖体薬を除く抗菌薬を広く排出すること、さらに MexXY-OprM は抗菌薬の存在によって誘導的に発現し、アミノ配糖体薬を含む抗菌薬を排出することを実験室株の変異株シリーズを用いて明らかにしてきた。本研究では、緑膿菌感染症の化学療法に欠くことのできないキノロン薬、アミノ配糖体薬およびカルバペネム薬に対する耐性への排出システム MexAB-OprM および MexXY-OprM の貢献を臨床分離株を用いて調べ、抗菌薬耐性菌出現の現状を排出システムのメンから解析した。また、排出システムの検出法について検討した。

【研究材料と方法】 臨床各科から分離した緑膿菌 104 株を材料に用いた。排出システムの発現は既報のウサギ抗 MexB、抗 OprM および抗 MexX 特異抗血清を用いた免疫プロット法と定量的 RT-PCR によって行った。また、遺伝子の破壊はすでに報告した相同的組み換え法により行った。また、抗菌薬感受性は寒天平板希釈法により測定した。

【結果および考察】 MexXY-OprM は野生株では発現していないが、オペロンの上流の *mexZ* 遺伝子の変異により発現し、キノロン薬やアミノ配糖体薬を排出し、これらの抗菌薬耐性に寄与する。臨床各科から分離され、アミノ配糖体薬(amikacin および tobramycin)やキノロン薬(levofloxacin, norfloxacin および sparfloxacin)に種々の感受性を示す緑膿菌株での MexXY-OprM の発現を免疫プロット法により調べたところ、27 株(26%)で発現が検出された。しかし、意外なことに MexX の構成的発現ではキノロン薬に対する耐性度が高かったが、アミノ配糖体薬に対する耐性度は低く、両抗菌薬で異なることが分かった。この原因を調べるために、norfloxacin や tobramycin を含む寒天培地で臨床分離株を培養し、MexX の発現を調べたところ、norfloxacin 含有培地での増殖によっては MexX の発現率は増加しなかったが、tobramycin 含有培地では非構成的発現株 77 株のうち 57 株(74%)で MexX の発現が検出された。これらの結果は MexXY の発現は感受性測定時にアミノ配糖体薬によって誘導されていることが、キノロン薬ではそれが起こっていないことが分かった。さらに、*mexX* 遺伝子の破壊によりキノロン薬やアミノ配糖体薬の感受性化が観察された。これらの結果から MexXY-OprM 排出システムがキノロン薬やアミノ配糖体薬に対する耐性に寄与することだけでなく、従来、キノロン耐性の中心的役割を担う排出システムが MexAB-OprM であると考えられてきたが、それに加えて、MexXY 発現の動向も調べてゆくことが必要であることが示された。また、現在、排出システムの発現検出を特異抗体を用いて行っているが、汎用性に問題があると考えられる。そこで、特異抗体に頼らない定量的 RT-PCR の適用を変異株シリーズで検証し、さらに臨床分離株への適応を試みている。この点についても結果を報告する。

同一患者より分離された *Helicobacter pylori* におけるクラリスロマイシン耐性株、
感性株の遺伝学的関連性の解析

金井京子 1,2、柴山恵吾 1、荒川宜親 1

1 国立感染症研究所・細菌第二部、2 東京理科大学大学院・薬学研究科

Helicobacter pylori 感染者は欧米などの先進国では約 20-30%、発展途上国では 70-90%、日本では 50-60%と報告されている。近年、治療薬の一つであるクラリスロマイシン(CAM)に対する耐性菌の出現が報告されている。臨床分離株の中で約 10%前後が CAM 耐性株であるとされ、我々が過去に行ったスクリーニングでも耐性株の割合は 61 株中 4 株(6.6%)であった。*H. pylori* のマクロライド系薬剤に対する耐性機序は、現在のところ薬剤の標的である 23S rRNA の遺伝子の点変異(2142G または A2143G)が主であると考えられている。臨床から分離された CAM 耐性株 8 株における我々の予備的調査でも、全ての株で A2142G または A2143G が確認されている。これら CAM 耐性 *H. pylori* のスクリーニングの過程において、同一患者より CAM 耐性株(MIC, 32 μ g/ml)と感性株(MIC, <0.125 μ g/ml)を同時に分離したので、それらの株の遺伝学的関連性を解析した。

耐性株、感性株の *flaA*、*ureAB*、*ureCD*、*cagA* 遺伝子について PCR-RFLP パターンの解析を行ったところ、両株のパターンは同じであった。また、23S rRNA 遺伝子の塩基配列は、耐性株が A2143G の変異を有していた他は両株とも全く同じであった。*H. pylori* は遺伝学的に非常に多様であると言われている。そこで、PCR-RFLP パターンおよび 23S rRNA 遺伝子の塩基配列を他の臨床分離株 15 株について比較したところ、それらは非常に多様で、由来の異なる株で全く同一のパターンを示すものは存在しなかった。この結果から、今回解析を行った CAM 耐性菌と感性菌は、同じ株から由来している可能性が高いと考えられた。*H. pylori* は他の菌種に比べて遺伝子の変異が非常に起こりやすいこと、また一般的に一人の人間の胃内に感染する *H. pylori* は複数の系統の株からなることが知られている。マクロライド系薬剤の投与により耐性株が選択され増殖するものと考えられているが、これらの株が分離された患者では、遺伝的に由来の異なる感性菌と耐性菌が最初から独立して存在していたのではなく、胃内での長期持続感染の間に、CAM 投与の影響で感性株より 23S rRNA 遺伝子に変異を獲得した耐性株が生じ、薬剤濃度の低い局所に生き残った感性株と共存していたものと考えられる。