

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)

【背景】これまでグラム陰性菌から分離された 16S rRNA メチレーズは *rmtA*, *rmtB*, *armA* の 3 種類が知られている。いずれの酵素も臨床で用いられるアミノグリコシド(AG)のほとんどが属する 4,6-disubstituted deoxystreptamine group に対して高度(MIC >1,024 µg/ml)の耐性を示す。我々は 16S rRNA メチレーズを保有する株のスクリーニング方法と検出方法を検討し、さらに 16S rRNA メチレーズの保有状況を調査した。

【方法】臨床で広く用いられグラム陰性菌の薬剤感受性検査で比較的ルーチンに測定がなされている amikacin (AMK)と gentamicin (GM)の両方に MIC >32 µg/ml 以上の株を選択した。この 2 種類の AG に耐性の修飾酵素は AAC(6') group があるためさらに arbekacin (ABK)の MIC >32 µg/ml 以上の条件を加えた。これらの条件を満たす株に対して 3 種類の 16S rRNA メチレーズに特異的な PCR probe で PCR 反応を施行した。以上の検査を *Pseudomonas aeruginosa* 549 株、*Serratia marcescens* 339 株、*Escherichia coli* 505 株、*Klebsiella pneumoniae* 443 株、*Enterobacter spp.* 326 株について試行した。

【結果】3種類の AG の MIC が >32 µg/ml 以上となった株は *P. aeruginosa* 2 株、*S. marcescens* 2 株、*E. coli* 2 株の合計 6 株であった。これらの株に 3 種類の PCR プライマーによって 16S rRNA メチレーズを保有しているか調べたところ全ての株で陽性で、その内訳は *rmtA* は *P. aeruginosa* の 2 株、*rmtB*, *armA* はそれぞれ *S. marcescens* と *E. coli* の 1 株ずつであった。3 種類の AG が MIC >32 µg/ml 以上で PCR が陰性の株は認められなかった。

【考察】臨床でグラム陰性桿菌の治療に用いる AMK と GM に加えて特殊な修飾酵素でしか不活化されない ABK を組み合わせることによって 16S rRNA methylase 産生株を簡単に分離可能であることを確認した。この方法を用いる事により比較的容易にスクリーニングを行うことがほぼ可能と思われる。さらに PCR 法を用いることによって既知の 3 種類の 16S rRNA メチレーズの型別を確定することは可能であるため、多くの施設で試みられたい。

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

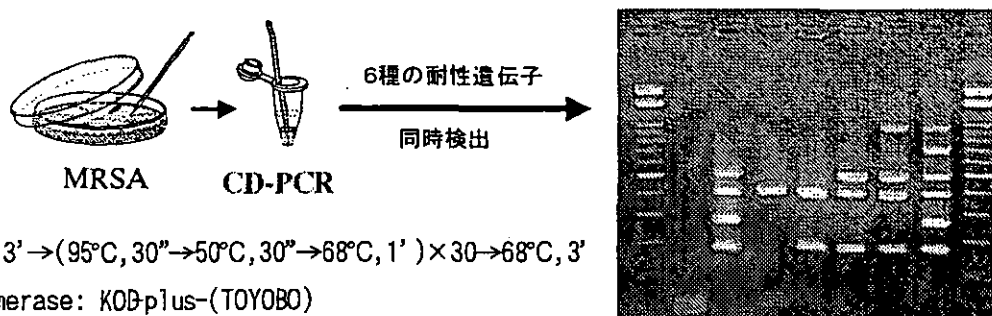
国立感染症研究所生物活性物質部

ゲノム情報を基にしたキー遺伝子の簡便検出法の確立により、調査対象耐性菌（感受性菌も含めて）の耐性遺伝子プロファイルおよび菌種特異的な遺伝子の迅速なモニタリングが可能となる。その情報に、耐性スペクトル、耐性因子と抗生物質の応答に関する情報を重ねることにより耐性菌の動向予測も可能となると思われる。このような考えから、MRSAにおけるアミノグリコシド（AG）耐性菌の動向予測のための第一歩として、AG修飾酵素遺伝子、*mecA* 遺伝子およびコアグラーゼ遺伝子型を簡便迅速に調べる方法をColony Direct Multiplex PCRおよび*coa A1uI*-RFLPによって確立し、MRSAにおけるこれらの遺伝子の分布について経年的な調査を行なった。

図1に6種の遺伝子のプロファイルを一度にチェックできるColony Direct Multiplex PCR法を示したが、以下のことがキーポイントとして浮かび上がった。① 高性能なDNA polymeraseを用いる：最近の改良型DNA polymeraseは良いが、初期のTaqなどは問題あり。② 反応液への添加菌量をごく少量に抑えること：目に見えない程度の量（ $10^1 \sim 10^4$ cfu/反応液）で十分（菌体添加量が過剰になると反応が阻害される）。

コアグラーゼ遺伝子に関しては、3' 末端領域の繰返し配列をColony Direct PCRで増幅後、*A1uI*による切断パターンから遺伝子型別を恣意的に行なった。

1980年頃から2000年までに臨床分離された400株以上のMRSAを調べた結果、80年代は、コアグラーゼ遺伝子型に4種のメジャーな型がダイナミックに変動しながら分布していたが、90年代になると1種類の型（L21）の寡占状態（90%）となっていることが認められた。AG修飾酵素遺伝子プロファイルは、コアグラーゼ遺伝子型によって特徴が認められた。AGの天敵ともいえる二機能酵素遺伝子*aac(6'')/aph(2'')*の分布はいずれの型においても高頻度であったが、L21型では約40%と他の型（77%以上）に比べて顕著に低いことが特徴的であった。



95°C, 3' → (95°C, 30" → 50°C, 30" → 68°C, 1') × 30 → 68°C, 3'
polymerase: KOD-plus-(TOYOBO)

Gene	Enzyme	Product	Resistance conferred	Primer sequence
<i>mecA</i>	PBP2'	519 bp	Methicillin and other β -lactams	F: 5'-TGTCCGTAACCTGAATCAGC-3' R: 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAG-3'
<i>aad(9)</i>	AAD(9)	1000	SPCM	F: 5'-CAAGAAAAGTTCTCGTTCCG-3' R: 5'-TCCTTCCCATTATCATCAC-3'
<i>aad(6)</i>	AAD(6)	750	6-OH: SM	F: 5'-CTTTAGCAGAACAGGATGAAC-3' R: 5'-AGGCATAATGAAGCCTTTCC-3'
<i>aac(6'')/aph(2'')</i>	AAC(6'')/APH(2'')	407	6'-NH ₂ / 2'-OH: all AGs	F: 5'-TACAGAGCCTTGGGAAGATG-3' R: 5'-CATTTGTGGCATTATCATCATATC-3'
<i>aph(3')-III</i>	APH(3')-III	269	3'-OH: KM, (AMK, ISP)	F: 5'-CTGATCGAAAAATACCGCTGC-3' R: 5'-TCATACTCTCCGAGCAAAGG-3'
<i>aad(4',4')</i>	AAD(4',4')	174	4',4'-OH: KM, DKB, AMK, ISP	F: 5'-CTGCTAAATCGGTAGAAGC-3' R: 5'-CAGACCAATCAACATGGCACC-3'

図1. Colony Direct Multiplex PCR

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

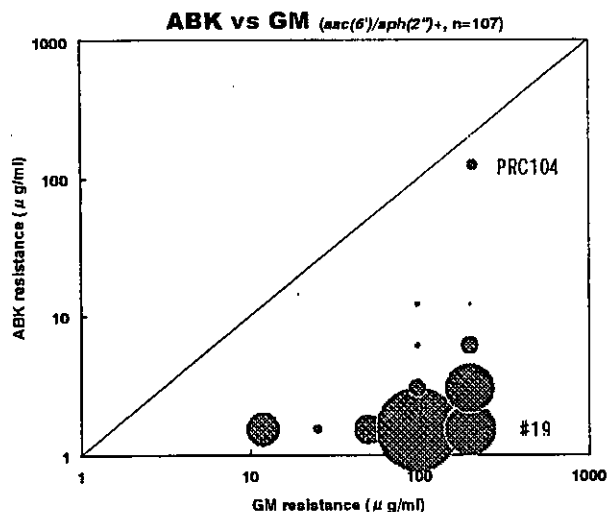
国立感染症研究所生物活性物質部

AAC(6')/*APH(2'')*はGM, SISO, NTL およびABKに対する唯一の耐性要因と判断されるが、一般的にABKに対してはリン酸化(2'-OH)しにくく、アセチル化(6'-NH₂)しても不活性化に至らないことから、*aac(6')*/*aph(2'')* 保持 MRSA はすべてGM 耐性であってもABK 耐性を示すものは数%でしかも低い耐性レベルに留まっている。

データベース化した情報を基に、*aac(6')*/*aph(2'')* 単独保持MRSA 菌株のAG 耐性について、横軸にGM、縦軸に他のAG (KM系とGM系) の耐性レベルをプロットして比較したところ、1位のアミノ基を特異な側鎖と置換した半合成AG (AMK, ABK, ISP, NTL) の抗菌活性がGMより高い(特にABKは4~5管) ことが明らかとなった(図1参照)。このことは、*aac(6')*/*aph(2'')* と*aad(4',4'')*の両方を保持するMRSA 菌株においても明瞭に認められた。これらの結果から、MRSAにおいてはアミノグリコシドの耐性菌対策の進歩が見事に反映されていることがわかる。

図1のプロットにおいて耐性傾向が一般的な菌株(従来型)と明らかに異なる菌株PRC104から*aac(6')*/*aph(2'')* をクローン化してAG 抗生物質のアセチル化とリン酸化の活性、遺伝子配列およびmRNA レベルなどについて調べた。その結果、従来型と比べてABK に対するリン酸化活性が高く、基質特異性が変化していること、APH(2') 領域に1アミノ酸置換を伴う1塩基置換が遺伝子上で起きていることが確認された。

PRC104株は、GM とABK に対する耐性が同等レベルであることが大きな特徴であり、これまでにこのようなABK 耐性MRSAは報告がないことから、今後の動向に注意をする必要がある。



PRC104	228	158	1158	228	置換(AVK)
#19	158	4	1158	228	置換(AVK)
	GM	ABK	<i>aac(6')</i> / <i>aph(2'')</i>	置換(AVK)	

図1. 変異型 (PRC104) と従来型 (#19) の性状

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}
群馬大院・医・細菌感染制御¹、同業剤耐性菌実験施設²、済生会習志野病院・細菌検査³、
国立感染研・細菌第二部⁴

【はじめに】

現在までのところ6種類のバンコマイシン耐性遺伝子群が知られている。そのうち臨床
上問題になるのは高度バンコマイシン耐性を示す A、B、D 型である。今回、世界的にも
数株しか報告のない VanD 型 VRE が初めて日本で分離されたので解析を行った。

【方法】

2000年9月に原疾患として糖尿病を持つ73歳男性の両下肢壊死褥創部及び便より分離
されたバンコマイシン耐性の腸球菌属を解析した。各種キット並びに16S rRNAのシーク
エンス解析により菌種を同定した。MICは寒天希釈法により決定した。接合伝達は一
夜培養された供与菌と受容菌を用い固形培地上で行った。一夜培養された供与菌と受
容菌を10 μ lずつ固形培地上に重ねてスポットし、終夜培養後エーゼにて掻き取り選
択培地上に塗布した。Southern Hybridization や Northern Hybridization には非 RI 系
を用い、プローブには PCR により増幅された断片をアガロースゲルから抽出して用
いた。

【結果と考察】

分離された菌株は同定の結果 *E. raffinosus* であった。MIC 測定の結果は VCM(1024 μ
g/ml)、TEIC(256 μ g/ml)、GM(2048 μ g/ml)、KM(2048 μ g/ml)、SM1024 μ g/ml)、
EM(2048 μ g/ml)、TC(256 μ g/ml)、ABPC(32 μ g/ml) であった。CP には感受性だった。

バンコマイシン耐性の型別を行うために *vanA*、*vanB*、*vanC*、*vanD1*、*vanE* に特異的
なプライマーを用いた PCR を行ったが陰性であった。そこで大腸菌の *ddlA*、*ddlB* と VRE
の *vanA* 型 ligase の間で保存されているアミノ酸配列から設計されたプライマーを用
いて PCR を行ったところ、増幅された DNA 断片を検出することができた。PCR に用
いたプライマーで直接シークエンスをしたところ *vanD4* と高い相同性が確認された。
VanD4 型の VRE は1株報告があり、その塩基配列を参考に作成したプライマーを用
いて PCR やシークエンスを行いリガーゼ遺伝子の残りの塩基配列を決定した。その
結果、1032塩基中2塩基(362番目のGがTに、930番目のCがT)が変化していた。コ
ードされるアミノ酸は121番目のGlyがValに変化したのみで、2番目の変異によ
ってアミノ酸は変化しなかった。この結果から、この *E. raffinosus* が VanD4 型
の VRE である事がわかった。

接合伝達実験を行ったがバンコマイシン耐性は伝達しなかった。また、プラスミド
の分離を試みたが明らかなプラスミドの存在が確認できなかった。このことから
バンコマイシン耐性遺伝子群は染色体上に存在している事が考えられた。バンコ
マイシン耐性遺伝子群の発現はバンコマイシンによって誘導される事が知られて
いるので Northern Hybridization を行い VanD 遺伝子の転写を調べたところ、
この VanD4 遺伝子群はバンコマイシン非存在下でも発現しており、恒常的に
発現している事がわかった。

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^{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
(国立感染症研究所 細菌第二部¹、名古屋大学大学院医学系研究科²)

【目的】インテグロン構造に担われた class A β -ラクタマーゼ遺伝子は現在までに VEB 型、GES 型の 2 系統が報告されている。今回我々は、国内ではじめて GES 型 β -ラクタマーゼ遺伝子を同定したのでその解析を行った。

【対象と方法】NICU で分離された 6 株のセフトジジム(CAZ)耐性 *K. pneumoniae* を対象に PCR による β -ラクタマーゼ遺伝子の有無と型を検索したところ、これらは全て GES 型の class A β -ラクタマーゼ遺伝子を保有していることが判明した。PCR product の塩基配列の解析からこれら 6 株中 5 株は bla_{GES-3} を、残り 1 株は bla_{GES-3} と比べ Ω -loop 内にアミノ酸の置換を有する bla_{GES-4} を保有していた。そこでこれらの遺伝子をクローニングし、 β -ラクタマーゼ遺伝子及びその周辺領域の塩基配列を決定した。MIC は常法により測定した。また、酵素学的パラメータの算出には pET ベクターで大量発現後、Mono-Q カラムにて精製した酵素を用いた。さらに、6 株の遺伝学的背景の解析には PFGE を用いた。

【結果と考察】GES-3 と GES-4 では Ω -loop 内の 170 番目のアミノ酸が異なっていた(GES-3:Gly, GES-4:Ser)。セファマイシン系及びカルバペネム系抗菌薬の MIC は、GES-3 産生株と比べ GES-4 産生株で高く、さらに GES-4 産生株はクラブラン酸、スルバクタムなどの β -ラクタマーゼ阻害剤に抵抗性を有した。またこれらの違いは酵素学的パラメータにおいても裏づけられた。両遺伝子はクラス 1 型のインテグロンに担われておりその周辺構造はほぼ同一であった。PFGE により今回解析した 6 株は遺伝学的に近縁であることが判明した。一般にセファマイシン系抗菌薬は class A β -ラクタマーゼには安定であると考えられているが、今回我々が解析した GES-4 β -ラクタマーゼは class A に属するにも関わらず明らかな分解能を有した。 Ω -loop 内の変異によりセファマイシン系抗菌薬分解性を獲得した class A β -ラクタマーゼ遺伝子が同定されたのは世界でこれが初めてである。

GES-3 産生株と GES-4 産生株は近似した PFGE パターンを示す事から、おそらく、GES-3 産生株がセファマイシンなどに晒された結果、その中から G170S 置換を獲得した β -ラクタマーゼを産生する株が選択され GES-4 産生株として増殖し分離されたものと考えられる。GES-4 産生株はセファマイシンに耐性を示ししかも阻害剤に抵抗性を示す事から、AmpC 型、CMY-型などと鑑別が難しく、 β -ラクタマーゼの型別を推定する際には、それらの存在を念頭に置く必要がある。

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

【目的】

近年、腸内細菌群よりプラスミド性 AmpC β -lactamase を産生する菌が出現し、国内外で次々と報告されている。当教室保存の臨床分離菌よりペニシリン・セフェム系薬に耐性を示す *Klebsiera pneumoniae* から *Escherichia coli* K-12 株にプラスミド pKU631 上にコードされた β -lactamase が接合伝達することが分かった。そこでこの耐性遺伝子の性状と発現機構を解明し、その出現背景を探ることを目的とした。

【方法】

(1)MIC は日本化学療法学会標準法に準じて行った。(2)接合伝達及び形質転換は *E. coli* KU2900 を受用菌として、(3) β -lactamase の酵素活性は UV 法で検討した。(4)塩基配列を決定するためにクローニングは pKU631 を *Bam*HI、*Bgl*II で消化し、その断片を vector pBC の *Bam*HI site に挿入し、pKU641 を得た。

【結果と考察】

(1)*E. coli* KU2900 への伝達株 KU6501 の MIC は ABPC>128 μ g/ml、CPDX 64 μ g/ml、CTX 及び CMZ は 4 μ g/ml、CAZ 8 μ g/ml、AZT 2 μ g/ml、CFPM \square 0.063 μ g/ml であった。(2) KU6501 の産生酵素は CET を基質にした時 0.49unit/mg protein であったが、ABPC、CTX に対しては活性が見られなかった。これらのことから pKU631 上には AmpC β -lactamase 産生遺伝子の存在が推定された。(3)そこで pKU631 のサブクローン pKU641 の塩基配列を決定した結果、*Citrobacter freundii* 由来であるプラスミド性 AmpC β -lactamase の CMY-4 をコードしていることが分かった。(4) この pKU641 の *blac*_{MY-4} 上流に IS の挿入が確認された。このことは染色体性 AmpC β -lactamase 遺伝子がプラスミド化する構成の一部を示すものと推測された。海外同様プラスミド性 AmpC β -lactamase の拡散が危惧される。

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

【目的】

第3世代のセファロスポリン系薬(以下 CEPs)に対して高い MIC を示すグラム陰性桿菌が臨床から広く分離されている。*In vitro* の系にて変異菌を分離した報告から、第3世代 CEPs に対して MIC の上昇した *Enterobacteriaceae* の多くは、class C β -lactamase 産生量が多いことが明らかとなっているが、CEPs 耐性臨床分離菌の遺伝子的な背景については殆ど解析が行われていない。

本研究では、第3世代 CEPs 耐性の臨床分離 *Enterobacter cloacae* において、如何なる遺伝子変異が class C β -lactamase の多量産生に関与しているかについて、class C 酵素の調節遺伝子である *ampD* 及び *ampR* を中心に検証した。

【方法】

臨床分離 *E. cloacae* は、CAZ の MIC が 16 μ g/ml 以上を示す 22 株を用いた。これに、*E. coli* K12 株(KU1)由来の野生型 *ampD* をクローニングしたプラスミド(pKU420)を形質転換し、野生型 *ampD* の共存株と非共存株とで酵素量及び MIC を比較した。MIC 及び酵素量の比較は、常法を用い測定した。Class C 以外の β -lactamase 遺伝子の検出には PCR 法を用いた。各遺伝子の DNA 塩基配列の解析には ABI310 を用いた。

【結果・考察】

E. cloacae 22 株の酵素産生量を調べた結果、pKU420 を共存させた内の 21 株で class C β -lactamase 産生量が有意に低下した。特に 21 株中 18 株では、CET を基質としたときの酵素活性が 0.1 unit/mg protein 以下と感受性菌レベルにまで低下した。また、pKU420 共存下でも酵素量が感受性菌に比べ高い株を 3 株(KU6334, 6343, 6344)確認した。うち KU6334 及び 6343 では *ampR* に点変異を確認し、それぞれ R86S 及び T64I であった。これら変異 *ampR* をクローン化し感受性菌(KU3262)に形質転換したところ、その酵素活性はいずれのクローンでも 1 unit/mg protein と元株に比べ 20 倍程度に上昇した。また、同様の実験を *ampD* 変異株でも行ったところ、変異型 *ampR* を共存させることで酵素量が上昇した。

以上の結果から、臨床分離 *E. cloacae* の CEPs 耐性菌の多くでは、*ampD* 変異株が優先的に選択されていることが明らかとなった。また、*ampD* や *ampR* のような各調節遺伝子の変異が重複することも、CEPs に対する高度耐性化の要因となっていることが示された。

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

国立感染症研究所 細菌第二部

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

【目的】近年、欧米では、TEM-, SHV-型などいわゆるESBL(基質拡張型β-ラクタマーゼ)を産生する株が増加し問題となっているが、我が国では、黒川によってTEM-91、SHV-24など新型のβ-ラクタマーゼも発見されているもののこの種のESBL産生株は未だ稀である。しかし、国内の臨床現場では、Toho-1型が最初に発見されるなど、CTXに高い分解活性を示すもののCAZなどを殆ど分解できないCTX-M型β-ラクタマーゼが多く分離される傾向がある。一方、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子のようにCTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子の一部もインテグロン構造に随伴して媒介されていることが海外で報告されつつあるが、我が国での保有状況は明らかでない。今回の我々の調査では、我が国におけるCTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌分離状況を明らかにするとともに、CTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌を対象にインテグラーゼ遺伝子の保有の有無、型別を試みたので報告する。

【対象と方法】2002年1月から2003年9月までに当研究所に耐性遺伝子検査依頼のあった1,034株のうちCTXのMIC値が64 µg/ml以上の菌株で、Twin test (ディスク拡散法) (黒川ら)にて、クラバン酸の共存により耐性が低下する菌株237株(18都道府県、45施設)を対象にPCRを行った。CTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子検出プライマーは、CTX-M-1型、CTX-M-2型、CTX-M-8型、CTX-M-9型特異的プライマーの4種類を用いた。また、2002年度検出株79株に関しては、インテグラーゼ遺伝子保有状況を調べるために、インテグラーゼ遺伝子検出用プライマーにクラス1型、2型および3型インテグラーゼ遺伝子特異的プライマーを用いPCRを行った。

【結果と考察】Rにて検出したCTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌は総数237株 (*Escherichia coli* 110株、*Proteus mirabilis* 71株、*Klebsiella pneumoniae* 34株、*Serratia marcescens* 9株、*K. oxytoca* 4株、*Acinetobacter baumannii* 4株、*Citrobacter freundii* 2株、*C. koseri* 1株、*Enterobacter cloacae* 1株、*E. aerogenes* 1株)であった。クラス1型(*intI1*)、2型(*intI2*)、3型(*intI3*)インテグラーゼ遺伝子特異的プライマーを用いてPCRを行った。*intI1*保有株は58株(73%)であったが、*intI2*および*intI3*保有株はなく、いずれも陰性だった株は、21株であった。最近の報告では、インテグロン構造の下流にORF513遺伝子とβ-ラクタマーゼ遺伝子が配置されていることが明らかとなっているが、今回の結果は、そのような株とともにインテグロンに随伴しないCTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子も相当存在する可能性が示唆された。インテグロンは、一般的にアミノ配糖体耐性遺伝子を媒介する事が多く、また国内分離株では、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を伴う事例も多く、今後の動向に注意する必要がある。

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³, 荒川宜親²
船橋市立医療センター 検査科微生物¹, 国立感染症研究所 細菌第二部²

【目的】*Proteus mirabilis* は尿路感染症の主要な原因菌の一つであると共に院内感染症の重要な原因菌で、且つ患者からの除菌が時に困難である。本菌の臨床分離株から検出される最も優位なESBLsはTEM由来であるがCTX-M型酵素が報告されるようになり臨床上懸念すべき問題となってきた。本報ではCTX-M-2型β-ラクタマーゼ産生性*P. mirabilis*感染症の院内流行事例について、分子疫学的解析並びに患者の臨床背景調査を行った結果を報告する。

【材料及び方法】2001年7月～2002年8月の期間に、船橋市立医療センター泌尿器科病棟において入院患者16名及び同時期に入院歴を有する外来患者3名の尿とその関連部位から分離された多剤耐性*P. mirabilis*19株を対象とした。MIC測定はNCCLSの微量液体希釈法により行った。PCR法により19株全株でCTX-M-2型β-ラクタマーゼ遺伝子を検出後、さらに構造遺伝子の塩基配列を決定した。遺伝子型別は、染色体DNA封入ゲルプラグを*Sma*Iで消化後、得られた消化DNAのバイアス正弦電場ゲル電気泳動像に基づいて行った。

【結果及び考察】*P. mirabilis*19株全株はCTX、CTRX、CPDX、AZT耐性で、CAZには感受性を示した。さらにCTXのMICはクラブラン酸の存在下で低下した。構造遺伝子の塩基配列はCTX-M-2型と100%の相同性を示した。遺伝子型別の結果19株中18株については同一(13株)又はこれと極めて類似した(5株)*Sma*I消化パターンを示したが、他の1株のパターンはそれらとは異なっていた。このことから遺伝的に関連性の高い18株と、これらと遺伝的には異なるが共通する薬剤耐性遺伝子を保有する1株に起因する院内感染が特定の病棟に発生していたことが示唆される。なお患者の臨床背景として、その多くの症例で本菌検出前一ヶ月以内にCEZ、CPZ-SBT、LVFXが高頻度に投与されており、基礎疾患としては泌尿生殖器系悪性腫瘍が13例を占めていた。また多くの患者に留置カテーテル処置が施されていた。追跡可能症例12例のうち4例についてはST、FMOX、LVFX、CPZ-SBT、CAZ等の併用投与で除菌が達成されたが、残りの8例では同薬剤やIPMによる治療でも除菌は困難であった。このことから本菌は低MIC値を示す薬剤によっても除菌が困難であったことに加え、患者が入退院を繰り返した結果として院内感染が拡大化した可能性も考えられる。ESBLs産生株による院内流行の報告はまれであり、本報はCTX-M-2型β-ラクタマーゼ産生株に起因する感染症が限定された病棟内に蔓延した事例として注目されるが、院内感染対策により最終的に制御に成功した。本報の詳細についてはJournal of Clinical Microbiology, vol. 42に掲載の予定である。

平成15年度厚生労働科学研究

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（H15-新興-9）

班会議 日 時：2004年1月13日（火）13：00 P.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. AmpC大量産生株中のESBL検出方法の確立に関する検討 山口恵三
2. 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 堀田国元
3. 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 渡邊治雄
4. サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学 山本友子
5. 定量的 RT-PCR 法を利用した緑膿菌多剤排出システムの発現検出 後藤直正
6. *Staphylococcus aureus* における penicillin-binding protein の分布 和田昭仁
7. 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 生方公子
8. セフェム系薬耐性に関わる遺伝子の迅速診断法の確立 井上松久
9. カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究：ダンシル基とチオール基をもつ蛍光剤によるメタロ- β -ラクタマーゼ (IMP-1) の検出 後藤正文
10. 臨床分離病原菌における薬剤耐性の分子機構ならびに遺伝子型別に関する研究 荒川宜親
11. VanD 型バンコマイシン耐性 *Enterococcus raffinosus* 池 康嘉

AmpC 大量産生株中の ESBL 検出方法の確立に関する検討

山口恵三、Alba Jimena、石井良和

東邦大学医学部微生物学講座

β -ラクタマーゼに安定な第三世代および第四世代セフェム系抗菌薬をも分解する基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(Extended-spectrum beta-lactamase)、いわゆる ESBL を産生株が欧米では院内感染の原因菌として注目されている。本邦でも、本酵素を産生する菌株の分離頻度が *Escherichia coli* や *Klebsiella pneumoniae* を中心に増加の傾向を示している。National committee of Clinical Laboratory Standard (NCCLS) は、*E. coli*、*K. pneumoniae* および *K. oxytoca* の ESBL 産生株のスクリーニング方法と確認方法を公表している。しかし、ESBL はこれら 3 菌種のみが産生するのではなく、その他のグラム陰性菌も産生する可能性を有している。事実、イタリアなどで実施されたサーベイランスでは、多くの腸内細菌科に属する菌種に ESBL が確認されており、わが国でも NCCLS が推奨する方法に規定されている菌種以外にも ESBL を産生する菌種が存在すると思われる。彼らのサーベイランスはレトロスペクティブに行われており、PCR 法により ESBL の遺伝子が確認されていた。しかし、臨床検査の現場においてこのような方法を実施することは困難であり、薬剤感受性試験の結果から直接、あるいはその変法を実施することにより判定できるのが理想である。今回私たちは、ディスク法の変法である、3次元拡散法を応用して AmpC 大量産生株が同時に産生する ESBL の検出法の確立を試みた。

Enterobacter cloacae NUH10 (AmpC 大量産生株)、*E. cloacae* P99 (AmpC 大量産生株)、ESBL 産生株として *E. coli* (Toho-1 産生株)、*K. pneumoniae* (SHV-26 産生株)、*Pseudomonas aeruginosa* (IMP-1 産生株)、*E. coli* (KPC-3 産生)、*E. coli* (TEM-1) 産生株、*Proteus mirabilis* (CTX-M-14 産生株) を供試菌株とした。培地はミューラーヒントン寒天培地 (日本ベクトン、東京)、薬剤感受性用ディスクとしてセフォタキシム、セフトジジム、セフェピム、イミペネム (日本ベクトン、東京) を、寒天培地上に塗布する感性株として *E. coli* ATCC25922 を使用した。3次元拡散法は、K. S. Thomson が報告した方法に準じて実施した。

E. cloacae NUH10 および *E. cloacae* P99 といった AmpC 大量産生株は、AmpC のセフェピムに対する分解する効率が悪いことから阻止円の縮小が認められなかった。一方、ESBL のセフェピムの分解効率がよいことから、阻止円の顕著な縮小を認めた。これらのことからセフェピムを用いて 3次元拡散法を行えば、AmpC 大量産生株が同時に ESBL を産生している場合でも、感度よく検出できるものと思われた。現在、多種類の酵素を使用して本方法の有用性の確認を進めている。また、IMP-1 産生株ではイミペネムおよびセフトジジムの阻止円の縮小が認められた。この方法を利用すれば、OprD の減少あるいは欠損によるイミペネム耐性と IMP-1 産生による耐性を区別することが可能となるものと考えられた。

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
 協力研究者 国立感染症研究所生物活性物質部 石野敬子

1. MRSAにおけるアミノグリコシド耐性

これまでの研究において、MRSAにおけるアミノグリコシド（AG）耐性の最大リスクファクターは、アセチル化とリン酸化の二つの機能を持つ二機能酵素の遺伝子であることが明らかとなった。この遺伝子の存否はゲンタマイシン（GM）耐性因果関係があること、抗MRSA剤のアルベカシン（ABK）にとっても唯一の耐性因子であるが、この遺伝子の保持によってABK耐性化する菌株は数%に留まっていること、コアグララーゼ遺伝子型（*coa AluI* RFLP）とAG修飾遺伝子プロファイルの間に密接な相関があることなどを見出した。このような状況に変動が見られるかどうかについて本年度分離された菌株を対象にモニタリングしている。

ABK耐性菌として分離された100株についてAG耐性、AG修飾酵素遺伝子プロファイル、および *coa AluI* RFLP を調べ、以下の結果を得た。

AG耐性とAG修飾酵素遺伝子プロファイルの相関性を調べた結果、ABKにもGMにも感受性で二機能酵素遺伝子も含まれていない菌株がかなりの頻度で含まれていた。耐性の判定精度を高めるためにはPCRによる遺伝子のチェックが不可欠と判断された。一方、コアグララーゼ型の分布には顕著な変動は認められず、型別の遺伝子プロファイルも同様と判断された（表1参照）。

表1. コアグララーゼ遺伝子型別AG修飾酵素遺伝子のプロファイル

<i>coa</i> 型	00以前修飾酵素遺伝子保持率				03年度分離株修飾酵素遺伝子保持率			
	443株	ac6'/ph2''	aad4'	aph3'	100株	ac6'/ph2''	aad4'	aph3'
L21	76%(337)	42%	91%	0%	83%(83)	(67)%	83%	0%
L22	8 (37)	89	8	49	0 (0)	-	-	-
L31	5 (23)	83	9	9	3 (3)	100	33	100
M22	4 (16)	100	75	0	4 (4)	100	75	0
Etc	7 (30)	77	70	0	10 (10)	90	80	0

2. 緑膿菌におけるアミノグリコシド耐性

緑膿菌においてはMRSAよりも多様なアミノグリコシド耐性プロファイルが知られており、各種のAG修飾酵素遺伝子が関与している。それらの遺伝子を特定するとともに迅速簡便な遺伝子モニタリングの方法の確立に向けての結果についても報告する。

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

渡邊治雄 廣瀬健二 (協力研究者)

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、現在もな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。

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見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、ニューキノロン低感受性株ではニューキノロン系抗菌剤に対する MIC が感受性株の約10倍またはそれ以上高い。また、ニューキノロン低感受性株は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を示す。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。ニューキノロン系抗菌剤の効果が見えない症例では第3世代セフェム系抗菌剤 (CTX, CTRX など) が使用される。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いま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菌の低感受性の原因は、GyrA の83番または87番のアミノ酸が突然変異により置換されていることである。私たちは、GyrA の83番または87番の点突然変異を PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 法によりスクリーニングする方法を開発した。PCR 法により *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅し *HinfI* で切断しポリアクリルアミド電気泳動で切断パターンを比較する方法である。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。

分担研究課題：サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学

分担研究者：山本友子（千葉大学大学院薬学研究院）

研究協力者：内村眞佐子、依田清江（千葉県衛生研究所）

渡辺治雄、泉谷秀昌（国立感染症研究所）

非チフス性サルモネラ症は世界的に最も頻度の高い食中毒であるが、我が国においては 1992 年に発生件数、患者数ともに第一位を占めて以来、発生状況は現在も大型化の傾向を示している。これらの原因となるサルモネラの血清型は様々であるが、近年わが国を含む先進諸国において特に問題となっているのは、*Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) とそれに次いで 2 番目に多く検出される *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST) である。特に多くの薬剤に耐性を示す多剤耐性の ST、中でも definitive type 104 (DT104) が急増していることである。多剤耐性 DT104 の複数の耐性遺伝子は、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から、薬剤の使用を止めても感受性に戻りにくく、食中毒発症時の治療を困難にしている。かかる現状において本研究は、我が国における DT104 をはじめとする *Salmonella* 多剤耐性菌の出現状況を明らかにし、さらに耐性機構並びに多剤耐性獲得機構の解明を目的として行われる。

本年度は、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い、以下の事柄を明らかにした。

(1) 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 耐性株 1 株および Sm, Su 耐性株が 12 株存在した。

(2) 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 *intI1Δ-pse1-qacE Δ1-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、ファージ型別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 *IntI1-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1* と *intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul* 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。この中には DT104 以外のファージ型が 2 株存在したことから、SGI1 の水平伝播が起きていると考えられた。1 株は *intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul* と他の class I インテグロンを有していたが MDR 領域全体の構造は異なっており、MDR の再配列が起きていると考えられた。

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。これらのファージ型を検討したところすべて DT104 以外のものであったことから、他の DT サルモネラにおいても新たな MDR による多剤耐性化が進行していることが懸念される。

(3) 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。

Characteristics of the 20 Typhimurium isolates harboring the class 1 integron

Year	Phage type	Integron	Designation
1998	Not DT104 related	<i>[IntI1-oxa1-aadA1-qacEΔ1-sulI]</i>	CK653
1999	DT104	<i>[intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[IntI1-aadA2-qacEΔ1-sulΔI]</i>	CK2 CK4 CK7 CK8 CK9 CK10 CK11
	Not DT104 related	<i>[intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and unidentified class 1 integron	CK657
	Not DT104 related	<i>[IntI1-oxa1-aadA1-qacEΔ1-sulI]</i>	CK3 CK6 CK658
2000	DT104	<i>[intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[IntI1-aadA2-qacEΔ1-sulΔI]</i>	CK15 CK16 CK17
	Not DT104 related	<i>[IntI1-oxa1-aadA1-qacEΔ1-sulI]</i>	CK23
2001	DT104	<i>[intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[IntI1-aadA2-qacEΔ1-sulΔI]</i>	CK26 CK28
	DT104B	<i>[intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[IntI1-aadA2-qacEΔ1-sulΔI]</i>	CK25
	U302	<i>[intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[IntI1-aadA2-qacEΔ1-sulΔI]</i>	CK30

[intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul] and *[IntI1-aadA2-qacEΔ1-sulΔI]*: 14/23 isolates

[intI1Δ-pse1-qacEΔ1-sul] and unidentified class 1 integron: 1/23 isolates

[IntI1-oxa1-aadA1-qacEΔ1-sulI]: 5/23 isolates

定量的 RT-PCR 法を利用した緑膿菌多剤排出システムの発現検出

後藤直正、○村田 健、西野武志
京都薬科大学・微生物

[目的] 感染症治療において使用される抗菌薬は、起因菌の感受性を加味して適切に選択されることが望まれる。現在行われている分離培養後の抗菌薬感受性測定に変わる新しい方法として、

感染症患者より得られた検体から抗菌薬耐性だけでなく、病原性などの情報を短期間に得られるシステム開発の一端として、本研究では臨床分離緑膿菌株を対象に抗菌薬排出システムおよび外膜透過孔に起因する抗菌薬耐性機構の発現を定量的 RT-PCR によって mRNA レベルで観察し、その結果と各種抗菌薬感受性とを比較することによって分離された緑膿菌株の抗菌薬感受性を mRNA レベルで推定可能かどうかを調べた。

[方法] 使用菌株として実験室株 PAO1 と人工的に構築した抗菌薬耐性機構発現株および欠損株を用いた。更に、2002 年 6 月から 2003 年 6 月に分離された緑膿菌株の内、MIC 値が IMP $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$ を 1 株、LVFX $\geq 12.5 \mu\text{g/ml}$ を 4 株、AMK $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ を 2 株、LVFX, AMK 交差耐性を示す 2 株、計 9 株を選択した。1 晩培養後の各菌体から Total RNA を精製し、抗菌薬排出タンパク質をコードする *mexB*, *mexY* およびカルバペネム系薬の透過孔をコードする *oprD* の発現を定量的 RT-PCR および特異抗体を用いたイムノプロットで観察し、抗菌薬感受性測定の結果と比較した。

[結果および考察] 実験室株 PAO1 と MexAB-OprM, MexXY, OprD それぞれの発現株および欠損株の定量的 RT-PCR およびイムノプロットによる発現量と抗菌薬感受性とを比較した結果、それぞれに良好な相関性が観察された。臨床分離株については、*mexB* および *mexY* の発現量は定量的 RT-PCR の結果とイムノプロットの結果とでほぼ相関していたが、mRNA 検出量が蛋白質検出量よりも若干高い株が数株存在していた。このことから、翻訳または翻訳後に何らかの制御が存在することが示唆された。*oprD* については、mRNA 検出量と蛋白質検出量間での相関性が乏しい結果となったが、現在、定量的 RT-PCR での検出プライマー配列が適切かどうかを調べるために今回用いた臨床分離株の *oprD* の塩基配列の解析を行っている。更に耐性遺伝子の mRNA の検出量と抗菌薬感受性を比較した結果、検出量が高いにもかかわらず、その耐性機構に起因する抗菌薬耐性が観察されない株が存在したが、逆に検出量が PAO1 と同等またはそれより低下している株では、耐性化を示す株は存在しなかった。このことは、臨床分離株の mRNA から抗菌薬耐性に影響を与える遺伝子の発現量を測定することによって、高発現していない耐性機構を推定し、それに応じた治療薬を選択できる可能性を示唆している。

*Staphylococcus aureus*における penicillin-binding protein の分布

○ 和田昭仁 (国立感染症研究所 細菌第一部)

methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA)、および methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)の増殖に、*S. aureus*のもつ penicillin-binding protein (PBP) 1が必須であることは、遺伝学的手法によりすでに示されている (J. Bacteriol. 180:2759-2765, 1998; 第1回薬剤耐性菌研究会抄録 [群馬県 2003])。しかし、PBP 1は、MRSAにおいても MSSAにおける場合と同様にβラクタム剤感受性であり、PBP アッセイにて低濃度のβラクタム剤との反応性を観察することができる。この二者の矛盾点 (遺伝学的に示された PBP1の必須性と、PBP アッセイで観察されるβラクタム剤感受性)を説明するために、蛍光 penicillin による PBP アッセイ、ならびに *S. aureus* 菌体表面と菌体内 PBP の観察をおこなった。

【方法と対象】MSSAとして NCTC8325 由来の BB255、MRSAとして COL をもちいた。これらの菌を直径 0.1 mm のマイクロビーズをもちいて破碎し、膜各分を調整した。PBP アッセイには 2 種類の蛍光 penicillin (Bocillin FL and Bocillin 650/665, Molecular Probe 社) をもちい、これらと反応させた膜画分をミニゲルで分離後、蛍光スキャナー (Typhoon 9400, Amersham Biosciences 社) でイメージを取りこみ、蛍光シグナルの定量を行った。菌体の染色には、上記蛍光 penicillin をもちい、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META, Carl Zeiss 社) による観察をおこなった。

【結果と考察】菌体を破碎し、調整した膜各分に未標識 penicillin G を暴露させ、その後に蛍光 penicillin を反応させる古典的な“競合” PBP アッセイでは、100 μg/ml の未標識 penicillin G にて、99%の PBP 1 および PBP 2 が蛍光 penicillin との反応性を失っていたが、菌体破碎前の全菌体に未標識 penicillin G を暴露させ、その後、菌体を破碎し調整した膜各分と蛍光 penicillin との反応性をみる PBP アッセイでは、約 10%の PBP 1 および PBP 2 を蛍光 penicillin にて検出することができた。この結果は、BB255 においても COL においても同じであった。これより、菌体に penicillin G を反応させた場合、本来は、βラクタム剤に感受性のある PBP がそれとの反応を免れるというモデルを考えることができた。penicillin V に、それと分子量がほぼ等しく疎水性の高い蛍光物質を結合させた Bocillin 650/665 を、BB255 および COL の菌体に反応させたとき、菌体の内部に Bocillin 650/665 由来の赤色のシグナルを検出することができた。このシグナルが、上記の penicillin G との反応を免れている PBP に由来するものであるかどうかを知るためには、各 PBP の特異的蛍光検出、proteinA の影響を受けないような金粒子免疫染色が必要である。

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」

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：北里大学北里生命科学研究所，大学院感染制御科学府感染情報学 生方 公子

§ 目的

呼吸器感染症の起炎菌となり得る菌種において，急速に耐性化が進行し，難治症例が目立つようになってきている。このような背景には，外来患者に対して細菌検索することなく empiric therapy の行われていることが適正とは言えない抗菌薬の使用に繋がり，耐性菌増加のひとつの要因になっている。耐性菌の増加を抑えるには，empiric therapy から evidence に基づいた化学療法(Evidence Based Chemotherapy: EBC)へレベルアップすることが必要で，結果的には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。当面の目標として，2-2.5 時間で主要原因菌を確定できる「呼吸器感染症・起炎菌検索キット」のシステム構築を目的にした。なお，本方法の最終目標は，入院患者に対しては少なくとも入院当日に，外来患者に対しては再診時に抗菌薬使用の是非も含めて最も適切な抗菌薬投与へと切り替えられるようにすることにある。

§迅速検索方法

市中で発症する吸器感染症の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，③ A群溶血レンサ球菌，④ *M. pneumoniae*，⑤ *C. pneumoniae*，⑥ *L. pneumophila* である。これらは同一条件でPCRが実行できること，感度を同一レベルに保つこと，増幅DNAの長さには差をつけていることが特徴である。それぞれのprimerの感度は1-7 CFU/reaction tubeで，検体採取用綿棒の先に 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とした。

§ 小児由来・上咽頭ぬぐい液への応用

上述した目的の遂行のために，「小児急性呼吸器感染症研究会(ARD)研究会」で収集した検査材料について検討を行った。

肺炎球菌やインフルエンザ菌，A群溶血レンサ球菌の陽性率は培養法よりもやや優れ，*M. pneumoniae*では培養法よりもはるかに優れ，*C. pneumoniae*に対しても確実に優れていると考えられた。小児での*Legionella*検出は1例のみであったが，別途依頼された成人例では陽性例を2例経験した。

§ 考察

ここに述べた起炎菌の迅速検索法は，網羅的検索を指向する方法のひとつに過ぎないと考えている。将来の迅速診断のあり方は，呼吸器感染症が疑われた症例に対し，抗菌薬投与前に菌検索と同時に耐性遺伝子検索までが高い精度で実施できることが必要である。

