

によって調べたところ、*mexB* 遺伝子発現量と *MexB* 発現量が相関しない株が認められた。また *MexAB-OprM* 以外の排出システム *MexCD-OprJ* や *MexXY* が発現している株も認められた。しかし、*MexB* 特異的抗体を用いたウェスタンイムノブロット法で *MexB* の高発現が観察された 12 株のすべてで、変異株を用いた実験と一致することが分かった。これらの結果から、本方法は臨床検査における *MexAB-OprM* 発現検出方法として実用性があることが示唆された。

D. 総括

本年度の研究によって得られた結果から次のことが示唆された。

1) *mexCD-oprJ* オペロンはキノロン薬や一部のベータラクタムの排出のみならず、細胞壁ペプチドグリカンの構成成分であるムロペプチド、特に 1,6-anhMurNAc pentapeptide ではなく GlcNAc-1,6-anhMurNAc pentapeptide を排出する。この結果、*mexCD-oprJ* 発現株では染色体性 AmpC β -lactamase の誘導が抑制され、imipenem などの一部のベータラクタムに対する高感受性化が起こる。このように *Mex* システムが GlcNAc 残基を認識することは本排出システムの阻害薬の創製に有益な情報であると考えられる。

2) *mexAB-oprM* 高発現株の検出法を開発し、臨床分離株に適用したところ、*mexAB-oprM* 高発現に起因したキノロン耐性株を簡便に検出できることが分かった。この方法の実用化によって *Mex* システムの臨床検査レベルでの検出が可能になると考えられる。これによって、排出システムの発現が原因である耐性菌のサ

ーベイランスが可能になるものと考えられる。

本補助金による研究成果の発表論文

1. Niga, T., Ito, H., Oyamada, Y., Yamagishi, J., Kadono, M., Gotoh, N., and Nishino, T. Cooperation between Alternation of the DNA gyrase genes and Overexpression of *MexB* and *MexX* Confers High-level Fluoroquinolone Resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.*, in press.
2. Yoneda, K., Chikumi, H., Murata, T., Gotoh, N., Ymamoto, H., Fujiwara, H., Nishino, T., and Shimizu, E. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Efflux Pumps by Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction. *FEMS Microbiol. Lett.*, in press.
3. 後藤直正. 2004. 私たちの研究「奇妙なキノロン薬耐性現象、異物(抗菌薬)排出システム、そして緑膿菌」。化学療法の領域 20: 739-746.

他の発表論文

1. 後藤直正、村田 健. 2004. 特集「会話する細菌-クオラムセンシング機構に見る微生物世界の不思議」緑膿菌のクオラムセンシングと異物排出システム. *臨床と微生物* 31: 271-277.
2. 後藤直正. 2005. 特集「Quorum-sensing 機構研究の新展開-呼吸器感染症を中心に-」緑膿菌のエフラックスシステムと Quorum-sensing 機構. *分子呼吸器病* 9: 22-25.

厚生労働省科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

臨床材料から分離された ESBL 産生および Shiga toxin を産生する
Escherichia coli に関する検討

分担研究者 山口恵三 (東邦大学医学部教授)

研究協力者 石井良和 (東邦大学医学部)

患者は9歳の女兒、腹痛および水様性下痢を主訴として2004年6月14日東邦大学医学部附属大橋病院小児科を受診した。同16日に提出された便検体から *E. coli* が検出された。O 抗原の型別は O26 であり、Vero 毒素の検査にて VT1 陽性、VT2 陰性と判定された。また、薬剤感受性試験成績から、本菌株に対するセフトキシムに対して $32 \mu\text{g/ml}$ 以上の MIC 値を示した。Clinical Laboratory Standard Institute が推奨するディスク法で ESBL の確認試験を実施した結果、本菌が ESBL を産生していることが強く示唆された。さらに、PCR 法により β ラクタマーゼ遺伝子の検出を試みたところ、CTX-M-9 が属するグループの特異的プライマーと反応した。さらに、遺伝子の塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列からこの β ラクタマーゼは CTX-M-18 であることが明らかとなった。

A. 研究目的

ESBL (Extended-spectrum β -lactamase: ESBL) は β ラクタマーゼに極めて安定な第三世代および第四世代セフェム系抗菌薬を分解し、これらの抗菌薬に対して耐性を示すことが知られている。本邦において、ESBL 産生株の多くは *Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca* あるいは *Proteus mirabilis* などの腸内細菌科の菌種から見出されている。Clinical Laboratory Standards Institute は、これまで *P. mirabilis* を検出の対象菌種としていなかったが、M100-S15 から対象菌種

としている。さらに、諸外国から腸内細菌科の多くの菌種が ESBL を産生しているとの数多くの報告がなされている。さらに、*Salmonella* あるいは *Shigella* など、いわゆる強毒菌が基質特異性拡張型 β ラクタマーゼを産生するという報告が散見されるが、*E. coli* O157:H7 などの病原性大腸菌の中に ESBL 産生株が存在したとの報告はない。2004年6月、東邦大学医学部大橋病院を受診した女兒より、Shiga toxin および ESBL を同時に産生する *Escherichia coli* が分離された。今回は本菌株の細菌学的性状ならびに耐性因子を明らかにすることを目的に検討を加え

た。

B. 研究方法

伝染性紅斑治療目的で 2004 年 5 月 17 日より東邦大学医学部大橋病院小児科に通院中の 9 歳女児が、5 月 21 日より腹痛、軟便を認め、6 月 14 日、腹痛に加え便が水様性を呈し、排便回数も 5 ~6 回/日に増加したため東邦大学医学部大橋病院を再受診した。6 月 16 日に細菌検査のための便が採取され、この検査において用いた培地は、5%羊血液寒天(日水製薬)、DHL 寒天(日水製薬)、TCBS 寒天(極東製薬)、スタヒロコッカス No.110(極東製薬)を用い 35°C好気条件で、またスキロー改良培地(栄研化学)を用い 42°C微好気条件で培養を行った。約 20 時間培養後、5%羊血液寒天にオキシダーゼ陰性のグラム陰性桿菌が、

多数発育した。なお、スタヒロコッカス No.110 はわずかにブドウ球菌の発育を認めたが、TCBS 寒天、およびスキロー寒天には培養 48 時間後も菌の発育は認められなかった。

本菌株が保有する ESBL の型別は、TEM-型、SHV-型および 3 種類の CTX-M-型のサブグループ特異的なプライマーおよび反応条件を用いたコロニーダイレクト PCR 法で Thermal Cycler 2400 (Applied Biosystems)を用いて実施した。すなわち、少量の菌株を滅菌爪楊枝で釣菌し、50 μ L の PCR 反応液中に懸濁し、95° C 5 分間の DNA の変成反応の後、95° C 3 秒、55° C 30 秒、72° C 30 秒で 40 サイクルの PCR 反応を実施した。なお、PCR 反応液は 50 pmol ずつの TEM-型、SHV-型、Toho-1 (CTX-M-2 グループ)、CTX-M-3、

Table 1. Primer sequences and predicted lengths of PCR amplification products

Primer	Direction	Primer sequence (5' to 3')	Fragment size (bp)
PCR primer sets of β-lactamase			
CTX-M-2	sense	GCGAACAGCGTGCAACAGCAGCTGG	521
	antisense	GCCAGCGCTTTACCCAGCGTCAG	
CTX-M-3	sense	GAGCATATGGTTAAAAATCACTGCGTCAGTTC	891
	antisense	CAGGGATCCTTACAAAACCGTCGGTGACGATTTTAGCC	
CTX-M-9	sense	GTTTGAGCATATGGTGACAAAAGAGAG GCAACGG	895
	antisense	CAGGGATCCTTACAGCCCTTCGGCGATG	
TEM	sense	GGGGAGCTCATAAAATTCCTTGAAGAC	1199
	antisense	GGGGATCCTTACCAATGCTTAATCA	
SHV	sense	GTTTCATATGCGTTATATTCGCCTGTG	876
	antisense	ATAGGATCCTTAGCGTTGCCAGTGCT	
Sequence primer for CTX-M-18			
	sense	AGAGAGTGCAACGGATGATGTT	
	sense	GTTGCAGTACAGCGACAATACC	
	sense	GCTGGTTCTGGTGACCTATTTTAC	
	antisense	GCCATAACTTTACTGGTACTGCAC	
	antisense	CTGGGTAAAAATAGGTCACCAGAAC	

CTX-M-9 に特異的なプライマー(Table 1)、2.5 unit の Taq DNA polymerase、dNTP を含んでいる。PCR 反応産物は 1.0%アガロースゲルを用い、電気泳動法にて特異的シグナルを検出した。陽性コントロールには TEM-型、SHV-型、Toho-1 (CTX-M-2 グループ)、CTX-M-3、CTX-M-9 産生株を用いた。(倫理面への配慮)患者様およびそのご家族に、退院後の外来受診時に、本症例が学術的に貴重な症例であることを説明した。その結果、患者様のご氏名を明らかにしない限り、学術集会ならびに学術雑誌上に臨床データを含め公表することに同意することを文書で確認した。

C. 研究結果

DHL 寒天に発育したコロニーを各

種確認用培地に接種した。TSI 培地に接種・培養した結果、斜面部および高層部で乳糖分解能またガス産生能も確認された。硫化水素の産生能は、TSI 培地および SIM 培地で確認されなかった。SIM 培地を用いて培養したところ、本菌はインドール陽性、IPA 反応陰性で運動性も有していることが確認された。シモンズクエン酸ナトリウム培地での培養結果から、クエン酸ナトリウムの利用能がなく、一般的な *E. coli* の生化学性状と一致した。さらに、MicroScan Neg Combo 5J パネル (Dade Behring Inc.) を用いて WalkAway SI による同定でも *E. coli* であることが確認され、さらに Phoenix system (Becton, Dickinson and Company) た。次に、病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて血清型別を実施したところ、本菌の O 抗

Table 2. Antibiotic susceptibility of clinical isolate and its conjugant

Antibiotics	<i>E. coli</i> TUM2319	Conjugant	Recipient
Piperacillin	128	64	≤0.25
Piperacillin/tazobactam	2/4	1/4	≤0.25/4
Cephalothin	512	512	0.5
Cefoxitin	4	2	≤0.25
Cefmetazole	1	1	≤0.25
Cefotaxime	256	32	≤0.25
Cefotaxime/clavulanic acid	≤0.25/4	≤0.25/4	≤0.25/4
Ceftazidime	2	2	≤0.25
Ceftazidime/clavulanic acid	≤0.25/4	≤0.25/4	≤0.25/4
Cefpodoxime	256	128	≤0.25
Ceftriaxone	256	128	≤0.25
Cefotetan	≤0.25	≤0.25	≤0.25
Cefepime	8	4	≤0.25
Aztreonam	8	8	≤0.25
Faropenem	≤0.25	≤0.25	≤0.25
Imipenem	≤0.25	≤0.25	≤0.25
Gentamicin	≤0.25	≤0.25	≤0.25
Kanamycin	2	≤0.25	≤0.25
Minocyclin	≤0.25	≤0.25	≤0.25
Nalidixic acid	4	≤0.25	≤0.25

原は26であることが明らかとなった。そこで、VTEC-RPLA「生研」(デンカ生研)を用いてVero毒素の検出を実施した結果、本菌はVT1陽性、VT2陰性であった。

薬剤感受性成績ではCTXのMIC値 $>32\mu\text{g/ml}$ となったためCLSIが推奨するESBLの確認検査をディスク法にて実施した。その結果、CTXとCTX/CVAとの阻止円径の差が14mmであり、本菌株がESBLを産生していることが強く示唆された。さらに、接合伝達試験の結果、本菌株の薬剤耐性因子は感性株に 10^{-4} の頻度で伝達された(Table 2)。

PCR法により、クラスAに属する β ラクタマーゼ遺伝子を確認したところ、CTX-M-9が属するサブグループ特異的プライマーのみに特異的に増幅されたシグナルが認められた。そこで、CTX-M-9の構造遺伝子の全長を増幅するプライマーにて当該CTX-M型 β ラクタマーゼ遺伝子を増幅し、その塩基配列を決定したところ、本ESBLはCTX-M-18であることが明らかとなった。

D. 考察

3類感染症である腸管出血性大腸菌感染症の多くは*E. coli* O157に起因するものであるが、わが国ではこれに次いで報告例の多い血清型がO26である。また、2001年以降O157ではVero毒素として、VT1およびVT2の両方を産生する菌株が6~7割であるのに対してO26ではVT1単独が8割以上を占めているとされている。*E. coli* O26によるSTEC感染症の多くは鞭毛抗原型がH11であるの

に対して今回検出された株はH7であった。腸管出血性大腸菌感染症の臨床経過に個人差はあるものの腹痛を伴う水様性下痢を発症し、2~3病日には鮮血が混じり、重症例では便成分を認めない血性下痢となり腹痛も増強するとされている。さらに、血液検査では発病初期には白血球は増多してもCRPは陰性というのも特徴のひとつとされている。

本症例では便への血液混入が認められなかったことを除けば臨床症状は上記に合致するものであった。なお、6月14日の下痢症状が著明になる前に認めていた5月21日の腹痛、軟便は一般的な腸管出血性大腸菌の潜伏期間(長くても2週間程度)から考えると発症前の兆候であった可能性は低いと思われた。

ESBLとして欧米ではTEM-型あるいはSHV-型が主流であるが、日本では1995年にIshiiらによってToho-1が初めて報告されて以来、Toho-1の属するCTX-M-型を産生する菌株が多く分離されている。ESBLをコードする遺伝子はプラスミド上に存在するため、菌種を越えて伝播する機会が多いと考えられる。データは示していないが、今回分離された菌株のESBLをコードする遺伝子が存在するプラスミドの接合伝達の頻度は、 10^{-4} 程度であることが分かっている。この伝達頻度は決して低いものではなく、このプラスミドを保有する菌株から、別の菌株へと容易に遺伝子が移動する可能性を強く示唆している。

これまで、ESBLを産生する腸管病原性大腸菌が分離されたとの報告はなかった。しかし、今回ESBLを産生する*E.*

coli O26:H11 が分離された。*E. coli* 157:H7 を含め、腸管出血性大腸菌に対する抗菌薬治療の是非に関しては現在も議論の最中である。しかし、一般には可能な限り、抗菌薬の投与は行わないのが良いとされている。本症例では、6月14日、外来にてラクミン2g、天然ケイ酸アルミニウム1.5g、塩酸ロペラミド0.8gを処方。同16日、細菌検査のため便を採取後、ホスホマイシン(FOM)が処方された。このときの便から Vero 毒素(VT1)を産生する *E. coli* O26 が検出された。25日ごろより下痢症状は改善傾向にあったがFOMは継続処方された。このように下痢患者が病院を受診した際に抗菌薬が経験的に投与される可能性は極めて高いと思われる。そのような場合、投与される抗菌薬によっては症状が重篤化する可能性があり、今後の耐性菌サーベイランスは血清型に関しても情報収集が必要であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Yoshikazu Ishii、 Jimena Alba、 Soichiro Kimura、 Katsuaki Shiroto、 Keizo Yamaguchi. (2005) Evaluation of antimicrobial activity of β -lactam antibiotics using Etest against clinical isolates from 60 medical centres in Japan. Int. J. Antimicrob Agents. In press
- (2) Soichiro Kimura、 Jimena Alba、 Katsuaki Shiroto、 Reiko Sano、 Yoshihito Niki、 Shigefumi Maesaki、 Koji Akizawa、 Mitsuo Kaku、 Yuji Watanuki、 Yoshikazu Ishii、 and Keizo

Yamaguchi. 2005. Clonal Diversity of Metallo- β -Lactamase-Possessing *Pseudomonas aeruginosa* in Geographically Diverse Regions of Japan. J. Clin. Microbiol. 43: 458-461.

- (3) Yoshikazu Ishii、 Soichiro Kimura、 Jimena Alba、 Katsuaki Shiroto、 Masanobu Otsuka、 Naotaka Hashizume、 Kazumitsu Tamura、 and Keizo Yamaguchi. 2005. ESBL producing Shiga Toxin (*stx*₂) positive *Escherichia coli* O26:H11: A new concern. 43 (3) in press

2. 学会発表

Yoshikazu Ishii、 Soichiro Kimura、 Jimena Alba、 Masanobu Otsuka、 Naotaka Hashizume and Keizo Yamaguchi. (2004) ESBL producing Shiga Toxin (*stx*₁) positive *Escherichia coli* O26:H11. The 3rd East Asian Conference on Infection Control and Prevention (Tokyo, Japan)

F. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

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)

研究要旨

昨年度の研究において食中毒散発事例より分離された多剤耐性 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium を対象に Ap 耐性の原因である β -lactamase のタイピングを行った結果、65%(15 株)が PSE-1 型、22%(5 株)が OXA-1 型、13%(3 株)がその他をコードしていることが明らかとなった。今年度は OXA-1 型耐性菌について遺伝子解析を行い以下のことを明らかにした。

- (1) OXA-1 型耐性菌はいずれも Ap,Sm,Su,Tc,Cm,Km,Ip の 7 剤耐性菌であった。
- (2) 耐性遺伝子はすべて同一と推定できる 150 kbp の Inc-FI 伝達性プラスミドにコードされていた。
- (3) プラスミドには異なる 2 種の class 1 インテグロン、In-t1 (*aadB-catB*) と In-t2 (*oxa1, aadA1*)が存在することが明らかとなった。プロトタイプの IncFI プラスミドが 2 種の class 1 インテグロンを獲得して進化し、サルモネラ多剤耐性菌の増加の一因となっていると考えられる。

多剤耐性サルモネラの中で最も分離頻度の高い DT104 は、Ap(PSE-1), Sm, Su, Tc, Cm 耐性遺伝子を *Salmonella* Genomic Island 1(SGI1)内に有している。SGI1 耐性遺伝子のプロトタイプを見出し、SGI1 構築のメカニズムを明らかにするために、我々が以前に 1975 年の臨床分離大腸菌が保有するプラスミド上に発見した PSE-1 を含むトランスポゾン Tn2610 の全塩基配列(23883bp)を決定し、詳細な構造解析を行った。その結果、Tn2610 と SGI1 は共通の祖先より進化したと考えられた。

研究協力者

内村眞佐子、依田清江 (千葉県衛生研究所)

A. 目的

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、*S. enterica* serovar Enteritidis (SE) とそれに次いで 2 番目に多く検出される *S. 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。このような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。昨年度は 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 株を対象に疫学的検討を行った。その結果は国内の多剤耐性サルモネラ検出状況と同様であったことから、本研究のように規模を縮小して詳細な分子疫学的研究を行うことにより、全国規模のサルモネラ耐性菌増加の分子基盤を推定することが可能であると考えられる。

B. 研究方法

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 株の中で OXA-1 β -lactamase を産生する耐性菌を対象に検討を行った。各種薬剤の MIC は寒天平板希釈法により測定した。PCR, Pulse field gel electrophoresis, Southern blotting, Cloning, DNA sequencing は定法に従った。Tn2610 を含むプラスミド pTKY170 の制限酵素地図を作成し、Subcloning を行って全塩基配列決定に用いた。

C. 研究結果及び考察

(1) OXA-1 型耐性菌はいずれも Ap,Sm,Su,Tc,Cm,Km,Tp の 7 剤耐性菌であり、耐性遺伝子はすべて同一と推定できる 150 kbp の Inc-FI 伝達性プラスミドにコードされていた(図 1、表 1)。class 1 インテグロンの存在を推定し、PCR および DNA sequencing により検討した結果、プラスミドには異なる 2 種の class 1 インテグロン、In-t1 (*aadB-catB*) と In-t2 (*oxa1, aadA1*)が存在することが明らかとなった(図 2)。このプラスミドは 1998 年に発生したサルモネラ食中毒の原因食由来菌(1 株)と 1999 年、2000 年に発生した食中毒患者由来菌(4 株)から分離されたことから、プロトタイプの IncFI プラスミドが 2 種の class 1 インテグロンを獲得して進化し、サルモネラ多剤耐性菌の増加の一因となっていると考えられる。

(2)多剤耐性サルモネラの中で最も分離頻度の高い DT104 は、Ap (PSE-1), Sm, Su, Tc, Cm 耐性遺伝子を SGI1 内に有している。我々は以前に 1975 年の臨床分離大腸菌が保有するプラスミド上に PSE-1 を含むトランスポゾン Tn2610 を見出し報告している。今回は、SGI1 の耐性遺伝子領域のプロトタイプを見出し、SGI 構築のメカニズムを明らかにするために、Tn2610 の全塩基配列 (23883bp) を決定し詳細な構造解析を行った。その結果、Tn2610 は、2 つの transposition module と 3 つの defective integron

を含むモザイク構造を有していることが明らかとなった（図3、図4）。その中のひとつのインテグロンは SGII の PSE-1 をコードする領域と 100%の相同性を持つことが明らかとなった。その結果、Tn2610 と SGII は共通の祖先より進化したと考えられた。

D 研究発表

高屋明子、友安俊文、渡邊正人、内村真佐子、依田清江、山本友子. サルモネラ DT104 の SGII を含む多剤耐性トランスポゾン Tn2610 の構造解析. 日本薬学会第 125 年会

表 1 Antibiotic resistance phenotypes of *S. enterica* serovar Typhimurium strains producing OXA-1 β -lactamase and type of plasmids

Strain	Year	Resistance phenotype	plasmid
CK3	1999	Ap, Cm, Sm, Su, Tc, Km, Tp	150 kb, IncFI
CK6	1999	Ap, Cm, Sm, Su, Tc, Km, Tp Ap (TEM type β -lactamase) Cm	150 kb, IncFI 75 kb
CK23	2000	Ap, Cm, Sm, Su, Tc, Km, Tp	150 kb, IncFI
CK653	1998	Ap, Cm, Sm, Su, Tc, Km, Tp	150 kb, IncFI
CK658	1999	Ap, Cm, Sm, Su, Tc, Km, Tp	150 kb, IncFI

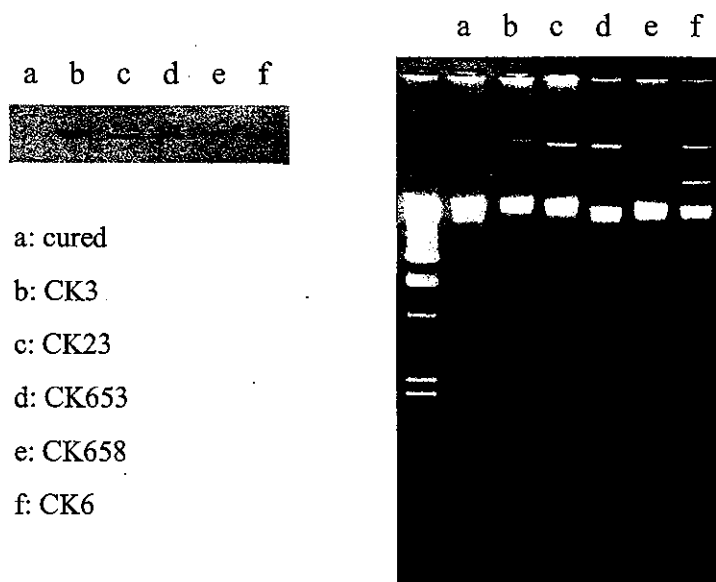


図 1 Plasmids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium OXA-1 producers

In-t1: 2.0 kb

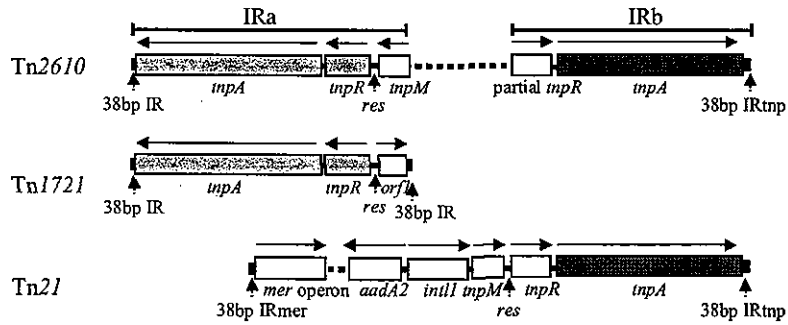


In-t1: 1.5 kb



图 2 Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI plasmid in *S. enterica* serovar Typhimurium

(A) Transposition Modules



(B) Defective Integrons

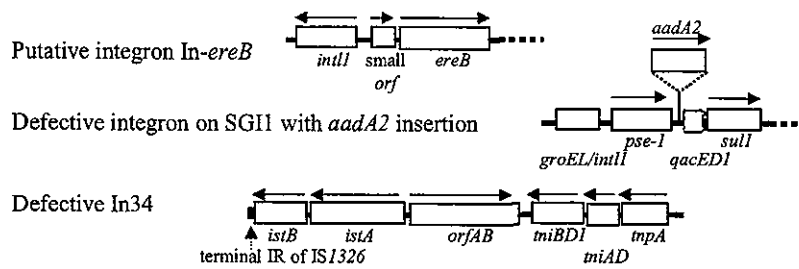


图 4 Structure of transposition modules (A) and defective integrons (B) consisting of Tn2610.

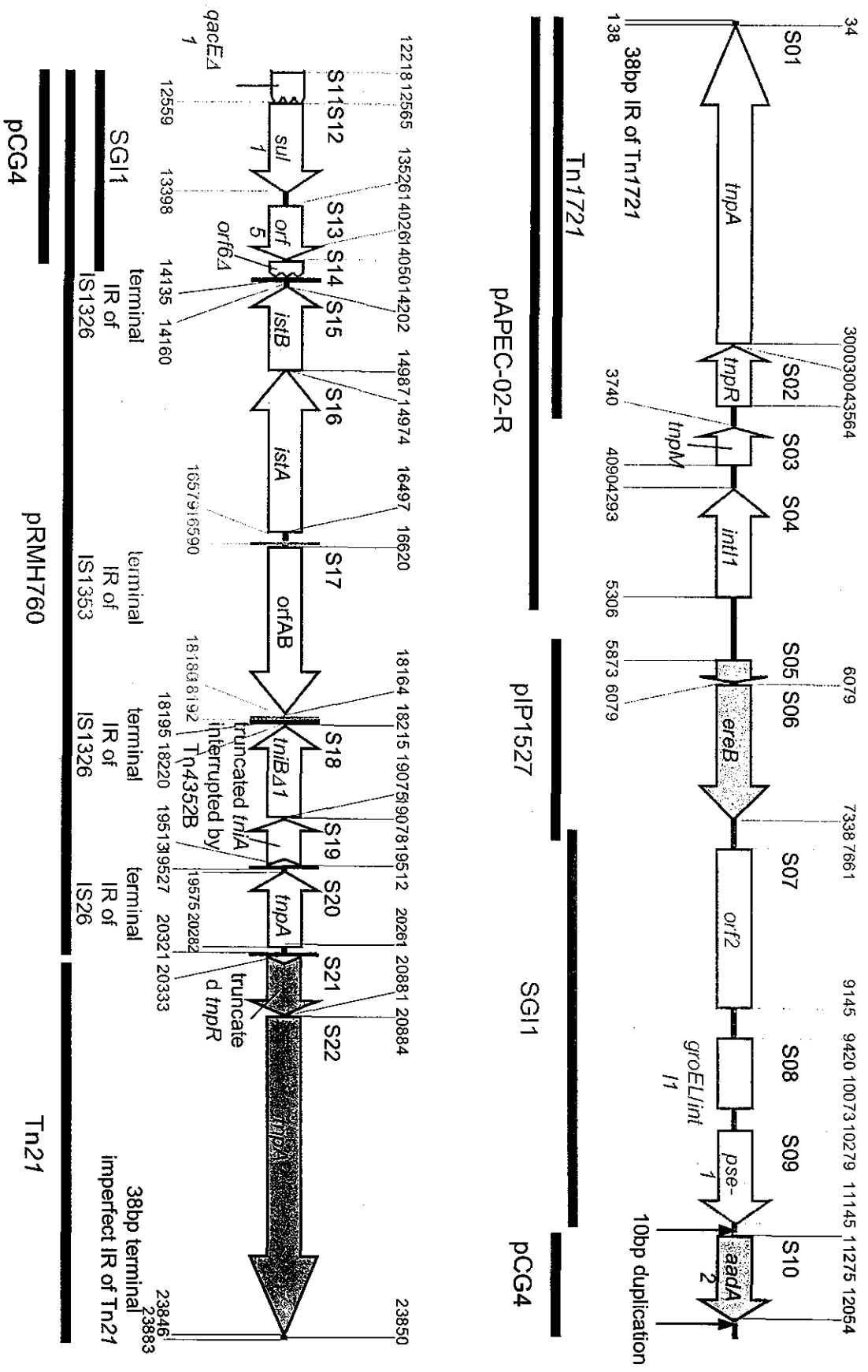


Fig 3 Genetic organization of Tn2610 based on the complete nucleotide sequence analysis

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」

リアルタイム PCR を用いたニューキノロン低感受性チフス菌パラチフス A 菌の迅速検出法の開発

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 副所長

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

研究要旨

現在腸チフス・パラチフスの治療上の問題となっているニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌の迅速検出法の開発をした。サイクリングプローブを利用したリアルタイム PCR で特異性が高く短時間で検出できる方法である。この方法により、約 1 時間でニューキノロン低感受性かどうかを判定することができる。

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薬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薬の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・パラ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薬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薬の効果がみられない症例が日本国内においても報告されている。このような腸チフス・パラチフスではニューキノロン系抗菌薬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、腸チフス・パラチフスの治療という観点から診断・治療の迅速化に貢献するため、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リアルタイム 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的とする。

従来のニューキノロン剤の感受性ディスクを使用した感受性試験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その感受性が中間もしくは感性与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 の測定は微量液体希釈法では、複雑な手技を要するため実用的ではない。また、現在はナリジクス酸感受性ディスクをスクリーニングに使用しているが、培養検査であるため一晩(約 18 時間)かかる。そのため本研究では MIC 測定、ナリジクス酸感受性ディスクによるスクリーニングより迅速で簡単なリアルタイム PCR 法を用いた検出法の確立を目標にしている。

2.方法

現在までの私たちの研究で、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た。この結果、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。また、83 番 TCC が、TAC または TTC に、87 番は GAC が TAC, AAC, GGC のように、特定の場所が決まった塩基に変異する。この点突然変異をリアルタイム PCR 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。点突然変異の特異的検出のためにサイクリングプローブ法を利用したリアルタイム PCR で検出方法を作成した。リアルタイム PCR に使用したプライマーとプローブを表 1 にまとめた。

はじめに、wild83probe (FAM ラベル)と wild87probe-2 (ROX ラベル)で *gyrA* に変異を持たない株のスクリーニングを行う。次に、変異があると分かった場合は、変異の同定用のプローブを用いて検査を行う。反応液、反応温度は表 2 のようにした。機械はタカラバイ

オ SamrtCycler を使用した。wild83probe (FAM ラベル)と wild87probe-2 (ROX ラベル)を使ったマルチプレックス PCR では変異がないと蛍光が検出される。FAM, ROX 両方の蛍光が検出された場合は 83 番、87 番ともに変異がないと考えられる。変異の同定には、Mutant83 (TTC) probe (FAM 標識)、Mutant 83 (TAC) probe (ROX 標識)、Mutant 87 (TAC) probe (FAM 標識)、Mutant 87 (AAC) probe (ROX 標識)、Mutant 87 (GGC) probe (FAM 標識)を使用して同様に PCR を行った。これらのプローブでは、各々の変異を持った株のみ蛍光が検出される。また、FAM と ROX 標識のものは混合して、マルチプレックス PCR として反応を行える。

菌株は日本国内で分離された株を使用した。試験に用いた株はあらかじめ、キノロン耐性決定領域の塩基配列を決定し変異の場所と置換された塩基を明らかにした。その後、リアルタイム PCR に用いて、各プローブの特異性を検討した。

3.結果・考察

サイクリングプローブを使用したリアルタイム PCR による *gyrA* 変異のスクリーニングおよび変異の同定の結果を表 3 に示す。スクリーニング用の wild83 プローブ、wild87 プローブは変異がないものを特異的に検出した。また、83 番、87 番変異の同定用プローブも、それぞれの変異に特異的に反応することが確認できた。この方法によりおよそ 1 時間以内に低感受性株のスクリーニングが可能になる。培養による感受性試験では一晩(約 18 時間)必要であるが、それに比較して格段に短時間で検査が可能になる。リアルタイム PCR では

非常に少量の DNA でも検出ができるため、普通寒天培地で純培養したチフス菌・パラチフスA菌数コロニーからDNAを抽出し使用すれば量は十分である。しかしながら、リアルタイムPCRでは、比較的純度の高いDNAでないと反応が進まないため少量のコロニーから純度の高いDNAを抽出することが今後の課題となる。また、この方法は臨床検体からの直接検出には上記の理由で使用できないと思われる。現在のところ、寒天培地上に発育した純培養のコロニーからの検査のみに利用できる。

ニューキノロン低感受性株は毎年増加を続けており2004年の分離株では、チフス菌で約70%、パラチフスA菌では約80%がニューキノロン低感受性を示す。この迅速検査法が利用されれば、腸チフス・パラチフスの治療に大いに貢献できると思われる。

参考文献

- (1) Hirose, K., Hashimoto, A., Tamura, K., Kawamura, Y., Ezaki, T., Sagara, H., Watanabe,

H. :DNA sequence analysis of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance determining regions of *Salmonella enterica* serovar Typhi, and Paratyphi A. *Antimicro. Agent. Chemo.* 2002.46, 3249-3252.

- (2) 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). *Research Advances in MICROBIOLOGY*, 2003, vol. 3, p108-117. Global Research Network, Kerala, India.
- (3) Hirose, K., Itoh, K., Watanabe, H. *Salmonella* spp. *Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics* 2005: 1186-1190. Jurgen Fuchs, Maurizio Podda ed. Marcel Dekker, NY.

表1 リアルタイムPCRに使用したプライマーとキメラプローブの配列

gyrAF primer	20mer	gtgACgTAATCggTAAATAC
gyrAF-2 primer	19mer	gTAATCggTAAATACCATC
gyrAF-3 primer	18mer	gTCgTTggTgACgTAATC
gyrAR primer	19mer	CgAAgTTACCCCTgACCCATC
gyrAR-2 primer	18mer	CAATAgAACCCgAAgTTAC
gyrAR-3 primer	19mer	CCgTCAATAgAACCCgAAg

			使用可能なプライマー対							
			F/R	F/R2	F/R3	F2/R	F2/R2	F2/R3	F3/R2	F3/R3
Wild 83 probe	11mer	TgCg (g) AATCgC	○	○						
Mutant 83(TTC) probe	11mer	TgCg (A) AATCgC				○	○	○		○
Mutant 83(TAC) probe	11mer	CTgC (g) TAATCg				○	○	○		○
Mutant 83(TAC) probe-2	11mer	TgCgT(A)ATCgC							○	○
Wild 87 probe	12mer	TAT(g)ACACCCATC	○	○						
Wild 87 probe-2	11mer	TgTATg (A)CACC	○	○						
Mutant 87(TAC) probe	11mer	TgTATT (A)CACC							○	
Mutant 87(AAC) probe	11mer	TgTATA (A)CACC						○		
Mutant 87(ggC) probe	11mer	TgTATg (g)CACC	○	○					○	○

表 2 反応液の組成(Takara CycleavePCR core Kitを使用)

10X CycleavePCR Buffer	2.5 μ l
dNTP mixture (2.5mM each)	3 μ l
Mg solution (25mM)	5 μ l
Forward primer (4 μ M)	1 μ l
Reverse primer (4 μ M)	1 μ l
各 Probe	1 μ l
RNase H	0.5 μ l
Ex taq	0.25 μ l
DNA	1 μ l
dH2O	9.75 μ l
Total	25 μ l (1本あたり)

反応温度

95度 20秒, 40サイクル(95度 15秒, 55度 15秒, 72度 15秒 40サイクル)

表 3 リアルタイム PCR の結果

(1) 83 番、87 番の *gyrA* 変異のスクリーニング

Sample name		wild 83 probe		wild 87 probe
83 番	87 番	FAM		ROX
Ty2	TCC	GAC	+	+
102	TTC	TAC	-	-
113	TTC	-	-	+
15	-	GGC	+	-
37	-	GGC	+	-
104	TAC	-	-	+
064	TAC	AAC	-	-

(2) 83 番変異の同定

		83 TTC probe	83 TAC probe
83 番	87 番	FAM	ROX
Ty2	TCC	GAC	-
102	TTC	TAC	+
113	TTC	-	+
025	TAC	-	-
015	-	GGC	-
027	-	TAC	-

(3) 87 番変異の同定

		87 TAC probe	87 AAC probe	87 GGC probe
83 番	87 番	FAM	FAM	ROX
Ty2	TCC	GAC	-	-
102	TTC	TAC	+	-
064	TAC	AAC	-	+
113	TTC	-	-	-
025	TAC	-	-	-
006	TAC	-	-	-
012	TAC	-	-	-
015	-	GGC	-	+

+ 蛍光が検出された

- 蛍光の検出されず

Staphylococcus aureus PBP のイミペネムに対する反応性

和田昭仁 (国立感染症研究所 細菌第一部)

昨年度の研究により、*Staphylococcus aureus* の細胞壁合成酵素の一つである PBP1 は、MSSA においても MRSA においても、その増殖に必須であることが遺伝学的に示された。しかし、この両者のもつ PBP1 は、ともに β -ラクタム剤感受性であり、MRSA の持つ PBP1 も MSSA 同様、低濃度の β -ラクタム剤と反応する。この相反する現象を説明するために未標識イミペネムと蛍光標識ペニシリンをもちいた定量 PBP アッセイをおこなった。全菌体中の PBP1 には高濃度イミペネム暴露によっても結合が見られない画分が存在し、これが機能することにより、 β -ラクタム剤存在下でも MRSA の増殖が起きているというモデルを考えることができた。

Staphylococcus aureus は市中、院内感染の起炎菌として重要であり、臨床的に薬剤耐性を獲得しやすいことが知られている。MRSA は methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) がもつ細胞壁合成酵素 (penicillin-binding protein [PBP]) 1-4 に加え、あらたに PBP 2' とよばれるペニシリン低感受性 PBP を持ち、これが β -ラクタム剤耐性の主要原因と考えられている。しかし、 β -ラクタム剤に暴露された MRSA では、PBP 2' 単独で細胞壁合成が行われているのかどうか、詳細は不明のままである。MSSA の増殖において、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(1)。昨年度の本研究において、黄色ブドウ球菌の細胞壁合成酵素の一つである PBP1 は、MSSA においても MRSA においても、その増殖に必須であることが遺伝学的に示された。しかし、 β -ラクタム剤と

PBP との反応性をみる競合 PBP アッセイでは、PBP1 は、MSSA においても MRSA においても、ともに β -ラクタム剤感受性と判定される。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 PBP1 の β -ラクタム剤感受性を矛盾なく説明するために、未標識イミペネムと蛍光標識ペニシリンをもちいた定量 PBP アッセイをおこなった。

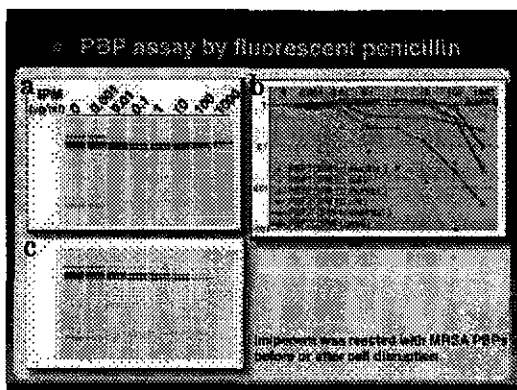
【対象と方法】 MSSA として NCTC8325 由来の BB255、MRSA として COL をもちいた。対数増殖期の菌体にあらかじめ、イミペネム (0.001 μ g/ml-1000 μ g/ml) を 30°C, 15 分反応させ、PBS で 3 回洗浄後、マイクロピーズを用いて菌体を破碎した。ここから調整した膜画分中の蛋白に対し、蛍光ペニシリン (10 μ M Bocillin FL, Molecular Probe 社) を反応させ、上記条件でイミペネムと反応しなかった PBP を検出した。PBP シグナル

の定量には蛍光スキャナー(Typhoon 9400, Amersham Biosciences社)をもちいた。

蛍光ペニシリンをもちいた菌体の染色像の観察、ならびに PBP1 と EGFP の融合蛋白の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META, Carl Zeiss 社) をもちいた。

【結果】 破碎して得た膜画分に対してではなく、破碎前の COL 全菌体にイミペネムを反応させると、0.1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 97% の PBP1 がイミペネムと反応することが観察されたが、1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度をもちいても残り約 3% の PBP1 は未反応のままであった。また、この高濃度条件下でも 20-25% の PBP2 はイミペネムとの反応を免れていた(Fig. 1a, 1b)。

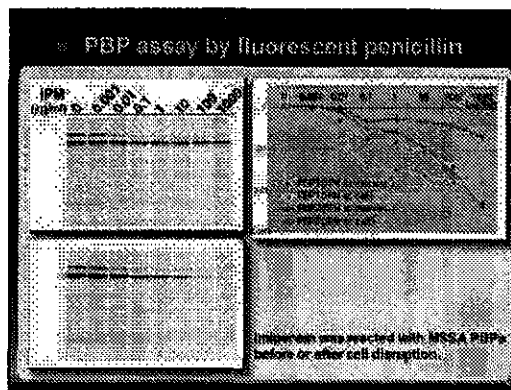
Figure 1



この現象は、これらの PBP のイミペネムに対する感受性が低いからではない。通常の競合 PBP アッセイのように、菌体破碎によって得られた膜画分中の PBP にあらかじめイミペネムを反応させ、その後、蛍光ペニシリンによって未反応 PBP を検出すると、イミペネム低感受性 PBP は MRSA の

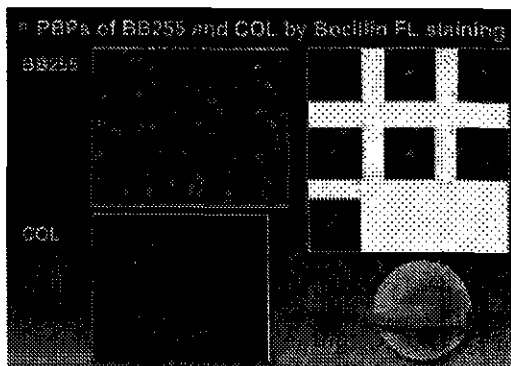
もつ PBP2' 以外には観察されない (Fig. 1c)。MSSA である BB255 の PBP1, PBP2 に対しておこなったアッセイでも同様な現象が観察された (Fig. 2)。

Figure 2



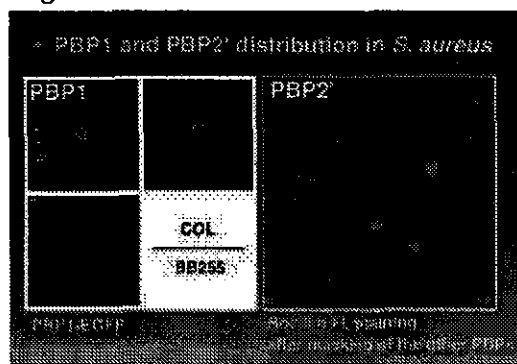
Bocillin FL を BB255 ならびに COL と反応させ、菌体表面の PBP を蛍光シグナルとして捉えると、PBP は菌体表面にうすく均一に分布するだけではなく、菌体を取り巻くリング状にも集積していることがわかる。これは、MSSA においても、MRSA においても同じであった (Fig. 3 左上下パネル)。このリングの作る面に一致して、隔壁が作られることが、分裂の異なる時期の菌体像を比較することによりわかる (Fig. 3 右上パネル)。

Figure 3 (H15 年度報告書より再掲)



これらの蛍光観察像は、PBP1-4、PBP2'のそれぞれを特異的に染色したものではないため、Fig. 3の右下に示したモデルで異なる色で表現しているPBPが、実際にどのPBPに相当するのかを知ることはできない。PBP1の分布を特異的に観察するため、PBP1とEGFPの融合蛋白を生成するプラスミドを作成し、BB255ならびにCOLにこのプラスミドを導入した。Figure 4左パネルに示すように、PBP1は、菌体表面上に分布する蛍光シグナルとして観察されたが、Figure 3で観察されたリング状の分布は示さなかった。

Figure 4



あらかじめCOLのPBP1-4をブロックし、その後にBocillin FLで菌体を染色することにより、PBP2'を特異的に観察すると、このPBPはPBP1同様、菌体表面上に分布し、一部、リング状の分布も示すことがわかった(Fig. 4右パネル)。

【考察】今回おこなった蛍光観察の結果、PBP1とPBP2'はどちらも、主に菌体表面上に分布することが明らかになった。また、この結果と昨年示した遺伝学的なPBP1の必須性から、以下

のようなモデルを考案することができた。MRSAにおいては、菌体表面にはPBP2'とPBP1ないし他の感受性PBPが存在し、 β -ラクタム剤存在下では、PBP2'が他のPBPの機能を代替し細胞壁合成を行うことができる。しかし、PBP1は菌体表面に分布するだけではなく、 β -ラクタム剤が容易に到達できない部位にも存在し、ここではPBP2'が代替できない役割を果たしている(PBP1とPBP2'の両者だけでMRSAの増殖に十分であるかどうかは今回の結果からはわからない)。このモデルの正当性を確かめるためには、今回観察されたイミペネム易反応性、および不反応性PBP1が、各々菌体のどこに存在するのかを明らかにしなくてはならない。そのためには、新たな蛍光検出系の開発や β -ラクタム剤と反応していないPBPだけを検出できるような抗体をもちいた免疫電顕による観察が必要であると考えられる。

【参考文献】

1. J. Bacteriol. 180:2759-2765, 1998.

【発表成果】

なし