

F. 研究業績

1. 論文発表

1. Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES and Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4760-2
2. Ishii Y, Kimura S, Alba J, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. *J Clin Microbiol* 2005;43:1072-5
3. Kimura S, Alba J, Shiroto K, et al. Clonal diversity of metallo- $\beta$ -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol* 2005;43:458-61
4. Kimura S, Ishii Y and Yamaguchi K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM- type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53:241-4
5. Shiroto K, Ishii Y, Kimura S, et al. Metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1 in *Providencia rettgeri* from two different hospitals in Japan. *J Med Microbiol* 2005;54:1065-70

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

研究課題 (1) サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学  
(2) 臨床分離フルオロキノロン高度耐性菌の耐性機構

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：

(1) 1990年代から世界中で急速に増加した多剤耐性サルモネラの現況を明らかにするため、1999年から2002年に発生したサルモネラ食中毒原因菌 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium の耐性遺伝子を解析し、前年度までの研究において65%が Ap, Sm, Su, Cm, Tc 耐性の DT104 であり、同一の多剤耐性遺伝子領域 MDR を有していることを明らかにした。DT104 との関連が予想されたトランスポゾン Tn2610 の全塩基配列を決定し比較解析した。その結果、DT104 の MDR は1975年に患者の尿路にすでに存在した Tn2610 上にその起源があることが明らかとなった。

(2) 臨床におけるフルオロキノロン耐性の現況を明らかにする目的で、2000年から2001年に分離されたグラム陰性桿菌の耐性疫学調査を実施し、日和見感染菌がかなりのスピードでフルオロキノロンに対し高度耐性化していることを明らかにした。高度耐性化が顕著であった *Proteus mirabilis* の耐性機構を解析し、高度耐性には、*gryA*, *parC* の変異に加え *gyrB* 変異が関与していることを明らかにした。

A. 研究目的

(1) 我が国において大型化の傾向にあるサルモネラ食中毒の原因菌として、特に多剤耐性 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST)、中でも definitive type 104 (DT104) が急増し、治療を困難にしている。昨年度までに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 ST 株を対象に疫学的検討を行い、全

国の多剤耐性サルモネラ検出状況とほぼ同様であることを明らかにした。DT104 は同一の多剤耐性遺伝子領域 MDR を有していたことから、本年度は MDR 構築のメカニズムを明らかにするために DT104 との関連が予想されたトランスポゾン Tn2610 の全塩基配列を決定し比較解析した。

(2) フルオロキノロン薬に対する耐性化の現況を、2000年~2001年に分離

された臨床由来株を用いて明らかにした。その中で尿路より分離された *Proteus mirabilis* にレボフロキサシン (LVFX) 超高度耐性菌が存在したことから、その耐性化機構の解明を行った。

## B. 材料と方法

- (1) トランスポゾン Tn2610: 1975年に千葉県下の医療機関で、患者尿路より分離された大腸菌が保有していたプラスミド pCS200 上に発見された (Mol. Gen. Genet. 189:282-288, 1983)。
- (2) LVFX 耐性菌: 2000年~2001年に東京都内の医療機関で分離された患者尿路由来グラム陰性菌 399 株を用いた。
- (3) MIC の測定、DNA 塩基配列の決定、LVFX 細胞内蓄積量の測定は定法に従った。

## C. 研究結果及び考察

- (1-1) 分離された ST 株の 65% が Ap, Sm, Su, Cm, Tc 耐性の DT104 であることが明らかになった。これは国内の多剤耐性サルモネラ検出状況と同様であることから、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。
- (1-2) DT104 との関連が予想されたトランスポゾン Tn2610 の全塩基配列を決定し比較解析した (Table 1, Fig. 1)。MDR の配列は Tn2610 の nt 7339-11274

に位置する配列 (*orf2-groEL/int11-aat11-pse1*) さらに nt12056-14134 の配列 (*qacA1-sul1- orf5-orf6A*) と完全に一致した。両領域間の nt11275-12054 は、*aadA2* の挿入であった。Tn2610 は 1975年に患者の尿路より分離された大腸菌が保有するプラスミド pCS200 上に、山本が 1983年に発見したものである。今年度の研究によって、Tn2610 上の 2つのインテグロンによりはさまれた領域が DT104 の MDR のプロトタイプであると考えられることができる (*Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. 50: in press)

(2-1) フルオロキノロン耐性グラム陰性菌の比率は、*Escherichia coli* で 6% (8 株/133 株)、*Klebsiella pneumoniae* で 2% (2 株/100 株)、*Pseudomonas aeruginosa* で 32% (38 株/118 株)、*Citrobacter koseri* で 84% (11 株/13 株)、*Serratia marcescens* で 23% (5 株/21 株)、*Proteus mirabilis* で 86% (12 株/14 株) であった。分離された耐性 *E. coli* に対する MIC はすべて 16  $\mu\text{g/ml}$ ~64  $\mu\text{g/ml}$  の高値を示した。又耐性 *P. aeruginosa* の中で MIC 64  $\mu\text{g/ml}$ ~512  $\mu\text{g/ml}$  を示す高度耐性菌は全体の 73% を占めており、かなりのスピードで高度耐性化していると考えられた。又、*P. mirabilis* における超高度耐性化 (MIC 1024  $\mu\text{g/ml}$ ) が顕著であった。

(2-2) *P. mirabilis* のフルオロキノロン耐性機構については報告例が少なく、又超高度耐性については未だ報告さ

れていないことから耐性機構を解析した。まず、フルオロキノロン耐性の主要因であるDNA gyrase 遺伝子 *gyrA*、*gyrB* および Topoisomerase IV 遺伝子 *parC*、*parE* 変異について解析を行った (Fig. 2、Table 2)。その結果、LVFX に対する MIC が 16 $\mu$ g/mL 以上を示す全ての耐性菌において、GyrA の変異 (Ser83Ile)、ParC の変異 (Ser80Ile)、ParE の変異 (Asp420Asn) が認められた。一方、MIC が 256-1024 $\mu$ g/mL を示す高度耐性菌においては、これらの変異に加えて GyrA の変異 (Glu87Lys) と GyrB の変異 (Ser462Phe) が共通に認められたことから、他の近縁菌種とは異なり、*P. mirabilis* のフルオロキノロン高度耐性においては GyrB の変異が寄与する可能性が示唆された。

次に、薬剤排出ポンプによるフルオロキノロン耐性への寄与について検討するため、LVFX の菌体内蓄積量を調べた。MIC 16-1024 $\mu$ g/mL を示した 10 株について比較検討した結果、LVFX の細胞内蓄積は同程度であった。このことから、本菌のフルオロキノロン超高度耐性化における薬剤ポンプの関与は低いと考えられる。以上の結果から、*P. mirabilis* のフルオロキノロン耐性においては、他の近縁菌種で報告のある *gyrA*、*parC* の変異加えて *gyrB*

の変異が重要であることが示された。しかしながら、MIC 256 $\mu$ g/mL を示す株でこれら全ての変異を獲得していたことから、MIC 1024 $\mu$ g/mL の超高度耐性株は新たなフルオロキノロン耐性化機構を獲得している可能性が考えられる。

#### D. 研究発表

##### 学会発表

1) 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SGI1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、2005年3月

2) 高屋明子、友安俊文、山本友子：フルオロキノロン高度耐性*Proteus mirabilis*の耐性機構、第3回耐性菌研究会、2005年11月

##### 論文発表

1) Takaya, A., Watanabe, M. and Yamamoto, T. 2006. Organization of Tn2610 containing two transposition modules. Antimicrob. Agents Chemother. 50 (4): in press

Table 1. Feature of ORFs and discrete DNA segments in Tn2610

Location <sup>a</sup> 5' - 3'	DNA segment	ORF <sup>b</sup>			% homology DNA/aa	Description of gene or gene product (accession no.)
		No.	Name	Size <sup>c</sup>		
1-38	IR			-	-	38 bp IR in IRa of Tn2610
34-3000		S01	<i>tnpA</i>	988	99.7/99.2	transposase from Tn1721 (X61367)
3004-3564		S02	<i>tnpR</i>	186	99.8/100	resolvase from Tn1721 (X61367)
3627-3755	<i>res</i>			-	-	<i>resIII</i> (3627-3656), <i>resII</i> (3661-3703), <i>resI</i> (3717-3755)
3740-4324		S03	<i>tnpM</i>	194	100/100	TnpM on Tn21 (AF071413)
4091-5376	5' CS			-	-	partial 5' CS of class 1 integron (AF261825)
4091-4114	IRi			-	-	IRi of class 1 integron (AF261825)
4293-5306		S04	<i>intI1</i>	337	100/100	integrase of class 1 integron (AY214164)
5873-6079		S05	small orf	68	100/100	small OFR from pIP1527 (X03988)
6079-7338		S06	<i>ereB</i>	419	100/100	erythromycin esterase type II (X03988)
7661-9145		S07	<i>orf2</i>	494	100/100	putative OrfA from SGI1 (AF261825)
9420-10073		S08	<i>groEL/intI1</i>	217	100/100	GroEL /integrase fusion protein from SGI1
9777-10209	5' CS			-	-	partial 5' CS of class 1 integron (AF261825)
10154-10209	<i>attI</i>			-	-	<i>attI</i> of class 1 integron (AF261825)
10279-11145		S09	<i>pse-1</i>	288	100/100	PSE-1 $\beta$ -lactamase from SGI (AF261825)
11275-12054		S10	<i>aadA2</i>	259	100/100	streptomycin resistance protein (AF164956)
12056-12114	59 bp			-	-	59 bp element of class 1 integron (AF261825)
12114-14134	3'CS			-	-	3' CS of class 1 integron (AF261825)
12218-12565		S11	<i>qacE<math>\Delta</math>I</i>	-	-	quaternary ammonium compound and disinfectant resistance partial protein on SGI
12559-13398		S12	<i>sulI</i>	279	100/100	sulfonamide resistance protein on SGI
13526-14026		S13	<i>orf5</i>	166	100/100	putative acetyl transferase in Tn21 (AF071413)
14050-14134		S14	<i>orf6<math>\Delta</math></i>	-	-	hypothetical partial protein (AF261825)
14135-14160	IR			-	-	terminal IR of IS1326 (AY123253.3)
14202-14987		S15	<i>istB</i>	261	100/100	unknown function of IS1326 (AY123253.3)
14974-16497		S16	<i>istA</i>	507	100/100	possible transposase of IS1326 (AY123253.3)
16579-16590	IR			-	-	terminal IR of IS1353 (AY123523)
16620-18164		S17	OrfAB	516	100/100	OrfAB from IS1353 (AY123523)
18180-18192	IR			-	-	terminal IR of IS1353 (AY123253.3)
18195-18280	IR			-	-	terminal IR of IS1326 (AY123253.3)
18215-19075		S18	<i>tniB<math>\Delta</math>I</i>	-	-	truncated TniB from In2 (U42226)
19078-19512		S19	<i>tniA</i>	-	-	partial TniA of In2 (U42226)
19513-19527	IR			-	-	IR of IS26 (AY123523)
19575-20282		S20	<i>tnpA</i>	235	100/100	transposase of IS26 (AY123523)
20321-20333	IR			-	-	IR of IS26 (AY123523)
20334-20881		S21	<i>tnpR</i>	-	-	truncated resolvase of Tn21 (AF071413)
20884-23850		S22	<i>tnpA</i>	988	100/100	transposase of Tn21 (AF071413)
23846-23883	IR			-	-	38 bp IR in IRb of Tn2610

<sup>a</sup> Nucleotide position in the sequence deposited under accession no. AB207867.

<sup>b</sup> Named ORFs are based on those previously characterized.

<sup>c</sup> Numbers of amino acid residues

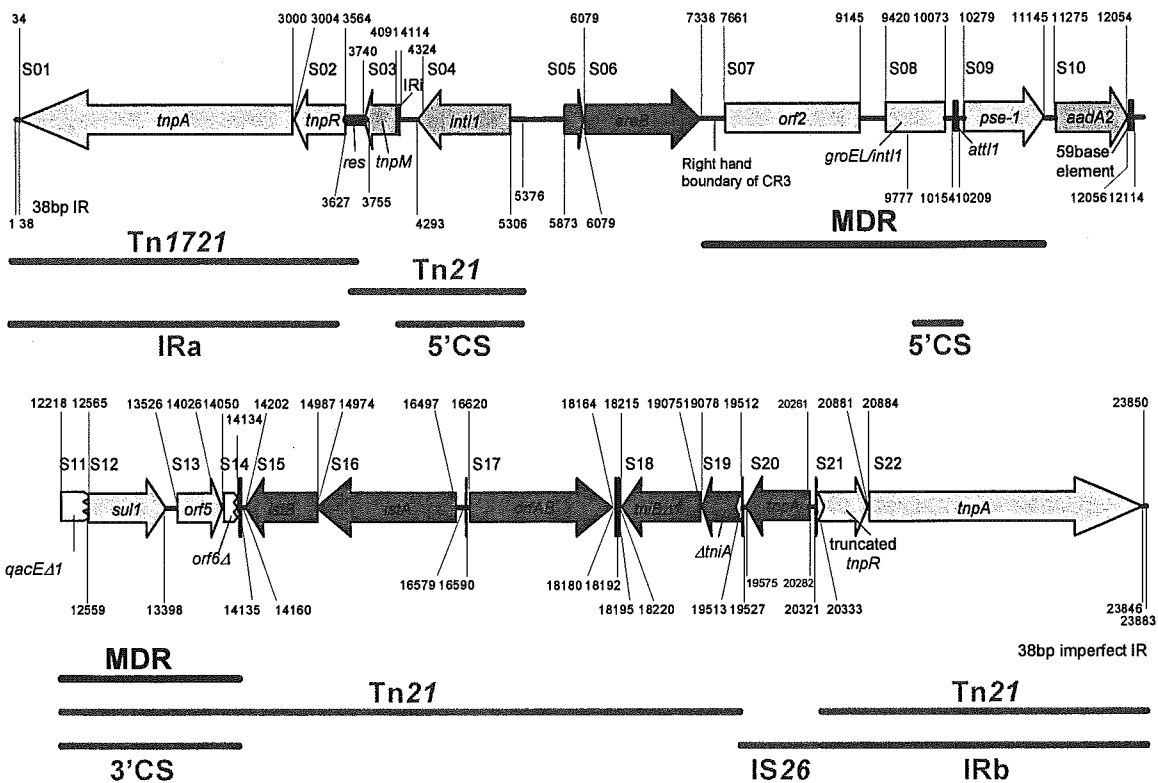


Fig. 1. Genetic organization of Tn2610 based on complete nucleotide sequence analysis.

<b>GyrA</b>	<i>P. mirabilis</i>	41	LKPVHRRVLF	AMNVLGNDWN	KPYKKSARVV	GDVIGKYHPH	83	87	GDSAVYETIV
	<i>E. coli</i>		.....Y	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....D...
	<i>P. aeruginosa</i>		.....	.SE.....	.....	.....	.....	.....	.....T...D...
<b>GyrB</b>	<i>P. mirabilis</i>	91	RLAQPFSMRY	MLVDGQGNFG	SVDGDSAAAM	RYTEVRMAKI	AHELLADL	138	
	<i>E. coli</i>		.M.....L..	.....	.I.....	.....	.I.L...	.....	.....M...
	<i>P. aeruginosa</i>		.M.....L..	.....	.N.....	.....	.....	.....	.....L.....
<b>GyrA</b>	<i>P. mirabilis</i>	324	SVKVPDPKFS	SQTKDKLVSS	EVKTAVETLM	NEKLVEYLLE	NPTDAKIVVG	KIIDAARARE	
	<i>E. coli</i>		.....	.....	...S...QQ.	..L.A.....	.....	.....	.....
	<i>P. aeruginosa</i>		.....	.SE.....	.....QE.	GKYFADF...	..NE..A...	.M.....	.....
<b>GyrB</b>	<i>P. mirabilis</i>	384	AARKAREMTR	RKGALDLGGL	PGKLADCSE	DPAFSELYLV	EGDSAGGSAK	QGRNRKTQAI	
	<i>E. coli</i>		...R.....	.....A..	.....Q..	...L.....	.....	.....	.....N...
	<i>P. aeruginosa</i>		.....	.....IA..	.....Q.K	...L...I.	..NE..A...	.....	.....R....
<b>GyrA</b>	<i>P. mirabilis</i>	444	LPLKGKILNV	EKARFDKMLA	SQEVATLITA	LGCGIGRDEY	NPKLRYHSI	IIMTDADVDG	503
	<i>E. coli</i>		.....	.....S	.....	.....	.....	.....	.....
	<i>P. aeruginosa</i>		.....	.....S	.....G.....	.....E..	.I.....	.....	.....N.....

Fig. 2-1. Amino Acid sequences of QRDR of GyrA and GyrB.

**ParC**

*P. mirabilis* 38 LKPVQRRIVY AMSELGLNSS AKFKKSARTV GDV<sup>80</sup>LGKYHPH GDSAC<sup>80</sup>YEAMV LMAQPF<sup>80</sup>SYRY  
*E. coli* .....A.....  
*P. aeruginosa* .....DAD S.H.....

*P. mirabilis* 98 PLIDGQGNWG APDDPKSFAA MRYTESRLSK YSQILLSELG HGTVDWIPNF DGTLQE  
*E. coli* ..V.....EL.....Q..A..V.....  
*P. aeruginosa* ..V.....A..R..EL.....Q.....V.....

**ParE**

*P. mirabilis* 327 PAFAGQTKER LSSRQTSFAV ASAVKNAFSL WLNQNVQ<sup>364</sup>VGE LLAEMA<sup>364</sup>ISSA QRRMRAAKKV  
*E. coli* .....CA...SGV..D..I.....AA.....  
*P. aeruginosa* ...S.....EAA...SGV..D....EHAET.L Q...L...N. G..LK.G...

*P. mirabilis* 387 VRKKLTSGPA LPGKLADCTS QDLRYTEFL<sup>420</sup> VEGDSAGGSA KQARDREYQA IMPLRGKILN  
*E. coli* .....A...NR.....K.....  
*P. aeruginosa* E...I.Q...AG .EPMRA.....K.F.....

*P. mirabilis* 447 TWEVSSDEVL ASQEVHDISV AIGMDPDSDD LSQ<sup>447</sup>LRYGKIC ILA  
*E. coli* .....I.....  
*P. aeruginosa* ....DGG...A...V..GAS..A.....

Fig. 2-2. Amino Acid sequences of QRDR of ParC and ParE

Table 2 QRDR amino acid substitutions and associated MIC of levofloxacin by *P. mirabilis* clinical isolates

Strain	MIC <sub>LVFX</sub> (µg/mL)	GyrA		GyrB		ParC	ParE	
		83	87	464	466	80	364	420
ATCC	<0.12	S	E	S	E	S	V	D
3000	<0.12	-	-	-	-	-	-	-
3004	4	I	-	-	-	I	I	-
3003	8	I	-	-	-	I	-	-
3013	16	I	-	F	-	I	-	N
3001	64	I	-	-	Y	I	I	N
3002	256	I	K	-	Y	I	-	N
3005	1024	I	K	F	-	I	-	N
3006	1024	I	K	F	-	I	-	N
3008	1024	I	K	F	-	I	-	N
3009	1024	I	K	F	-	I	-	N
3010	1024	I	K	F	-	I	-	N
3011	1024	I	K	F	-	I	-	N
3012	1024	I	K	F	-	I	-	N

平成 17 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報告書

「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」

分担研究課題：

1. リアルタイム PCR を用いた血液中からのチフス菌・パラチフス A 菌の迅速検出法の開発
2.  $\beta$ -ラクタム剤に対する耐性度が低下した変異株を生じる肺炎球菌の解析

分担研究者	渡邊治雄	国立感染症研究所 副所長・細菌第一部 部長
研究協力者	1. 廣瀬健二	国立感染症研究所細菌第一部 第二室 室長
	2. 和田昭仁	国立感染症研究所細菌第一部 第三室 室長



## 1. リアルタイム PCR を用いた血液中からのチフス菌・パラチフス A 菌の迅速検出法の開発

### 研究要旨

腸チフス・パラチフスはしばしば不明熱として扱われ診断までに時間を要することが多い。腸チフス・パラチフスは正確な診断と適切な抗菌薬の投与なしでは治癒しない。血液培養による菌の分離が腸チフス・パラチフスの診断には、最低でも 4 日間を要するため、迅速に治療を開始できない。本研究では腸チフス・パラチフスの診断までの時間を短縮するために、リアルタイム PCR を用いて患者血液中から直接チフス菌・パラチフス A 菌の存在を証明し診断する方法を確立することを目的とする。

### A. 研究目的

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、公衆衛生上の問題となっている。現在、腸チフスの診断方法は、血液または便からの菌の検出をする培養法が一般的である。従来の培養法では、患者が受診してから腸チフスの診断までは最低4、5 間にかかる。腸チフスの治療は、適切な抗生物質の速やかな投与によるため、迅速に診断することが必要である。本研究では、患者血液中からリアルタイム PCR 法でチフス菌・パラチフス A 菌の存在を確認し、診断できる方法を開発し、簡易で迅速な腸チフス・パラチフスの診断方法を確立することを目標にする。

### B. 方法

#### 1)リアルタイム PCR

チフス菌・パラチフス A 菌のリアルタイム PCR 法による検出では、チフス菌の Vi 抗原合成遺伝子(vipR)、O9 抗原合成遺伝子 (tyv)、鞭毛抗原遺伝子 (fliC-d)の3つの遺伝子を検出し同定するという方法を利用する。また、パラチフスA菌では、O2抗原合成遺伝子 (parat)、鞭毛抗原遺伝子 (fliC-a) を検出する方法を利用する。

従来のサルモネラの同定は、選択分離培地で発育した疑わしい菌の生化学性状を調べ、O抗原とH抗原(一相、二相)の組み合わせを決定し、Kauffmann-White の抗原構造表の記載から同じ抗原構造をもつものを探し血清型を決定する。今回開発した方法は免疫血清との凝集反応を利用したサルモネラの血清型別の方法論である O 抗原と鞭毛抗原の組み合わせで血清型を決定するという方法と同じ考えかたであるために、確実にチフス菌が同定可能である。サルモネラの約2000種類の血清型中にチフス菌の抗原構造 9,12[Vi]:d:-をもつものはチフス菌のみであるため Vi 抗原合成遺伝子、O9 抗原合成遺伝子、鞭毛抗原遺伝子の3つの遺伝子をもつ細菌はチフス菌のみである。このため、リアルタイム PCR で Vi 抗原合成遺伝子、O9 抗原合成遺伝子、鞭毛抗原遺伝子の3つの遺伝子が検出されればチフス菌と同定できる。同様に、O2抗原合成遺伝子と鞭毛抗原遺伝子 fliC-a 遺伝子を持つ物はパラチフス A 菌と同定できる。リアルタイム PCR では目的遺伝子の特異的に検出する方法であるサイクリングプローブ法を利用した。リアルタイム PCR 用プライマーは、Vi 抗原合成遺伝子 (vipR-s, vipR-as)、O9 抗原合成遺伝子 (tyv-s, tyv-as)、O2抗原合成遺伝子 (tyv-s, tyv-as プローブで O9 と区別する)、鞭毛抗原遺伝子 (fliCd-s, fliCd-as, fliCa-s, fliCa-as)

の8本(4組)のプライマーとVi抗原合成遺伝子用プローブ(vipR-p)、O9抗原合成遺伝子用プローブ(tyv-p)、O2抗原合成遺伝子用プローブ(para-p)、鞭毛抗原遺伝子用プローブ(fliCd-p, fliCa-p)を用いて行った(表1)。リアルタイムPCRの反応と組成は表3の通りである。リアルタイムPCR用サーマルサイクラーはSmart cyclor system(タカラバイオ)を用いて行った。反応条件等は表2の通りに行った。

## 2) 血液中からのDNAの抽出

血液中からのDNAの抽出にはキアゲンのDNA抽出キットを使用した。今回は擬似的にヒトの血液中に一定量の菌(10倍段階希釈系列)を入れてキアゲンDNA抽出キットでDNAを抽出した。患者より採血した血液中には通常抗凝固剤が入っているため、3.14%クエン酸ナトリウム溶液を血液に10分の1量加えてサンプル血液とした。段階希釈した菌液10 $\mu$ lをクエン酸ナトリウム入り血液100 $\mu$ lに加えてDNA抽出キットでDNAを抽出した。そのDNA溶液2 $\mu$ lをリアルタイムPCRのサンプルに使用した。比較用のコントロールとしてクエン酸ナトリウム入り血液の代わりに生理食塩水100 $\mu$ lを用いた実験を並行して行った。

## C. 結果

この方法を利用して、血液中からチフス菌・パラチフスA菌DNAを抽出し、チフス菌・パラチフスA菌の同定が可能であるかどうかを検討した。実験は1)リアルタイムPCRによる同定部分と2)血液中からDNAを抽出しリアルタイムPCRの検出感度を調べる部分とに分けて行った。

### 1)リアルタイムPCRによる同定

チフス菌・パラチフスA菌と類似した抗原構造をもつサルモネラ血清型(O2、O9、H-d、H-a抗原を

もつサルモネラ)、その他の腸内細菌を用いて、チフス菌・パラチフスA菌を正確に同定できるかを検討した。表3に示すとおりそれぞれのプライマー・プローブは目的とする物のみを特異的に検出することがわかった。チフス菌と構造が類似した菌はO9抗原とH-d抗原をもちチフス菌と同じ抗原をもつが、これらはVi抗原を検出するプライマーを入れたことにより、チフス菌と区別することができた。パラチフスA菌もO2、H-aの組み合わせで特異的に検出することがわかった。また、サルモネラ以外の腸内細菌 *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*を検討した結果、陽性の反応を示すものは見られなかった。

### 2) 血液中からDNAの抽出とリアルタイムPCRの検出感度

リアルタイムPCRの検出感度の検討にはパラチフスA菌用のfliC-aプライマーとプローブを利用して行った。生理食塩水中に菌を懸濁したものからDNAを抽出した場合、チューブ1本(100 $\mu$ lのクエン酸ナトリウム入り血液または生理食塩水)あたり生理食塩水では17.5CFUの菌数まで、血液では175CFUまで検出できることがわかった。つまり、血液1mlあたり1750個の菌がいれば検出できることになる(表4)。図1では、この生理食塩水での検討の結果、菌量とサイクル数の相関関係の直線性を調べた。その結果、直線性は良好で菌数に応じて検出サイクル数が早くなる関係には、相関関係が認められた。

## D. 考察

本研究では、患者血液中からリアルタイムPCR法でチフス菌・パラチフスA菌の存在を確認し、診

断できる方法を開発し、簡易で迅速な腸チフス・パラチフスの診断方法を確立することを目標にしている。今回は、リアルタイム PCR によるチフス菌・パラチフスA菌の同定部分は、完成したと考えられる。血液中からのDNA分離部分では、検出限界感度が血液1mlあたり 1750 個という比較的感度の悪い結果となってしまった。リアルタイムPCRのDNAの検出感度は非常によく、DNA1fgあれば検出ができるというデータもあるため、血液1mlあたり 1750 個の菌が感度の限界ということはDNAの抽出に問題があるか、溶液中にPCR反応の阻害物質の混入が考えられる。今後この問題点を解決すべく実験を進め実用可能なレベルの感度まで到達させたいと思う。

#### E. 結論

現在、培養からのチフス菌の検出には、血液または糞便培養による菌の検出、菌の同定、血清型別というステップを経るため、培養を開始してから最低4日間は必要である。また、様々な種類の培地の準備や、H抗原の決定など煩雑な手技を要するため、時間がかかる。リアルタイム PCR 法を利用した迅速検出方法では血液を採血した時点で検査を開始すると、約2時間でチフス菌・パラチフスA菌が血液中にいるかどうかを判定可能である。このため、約4日ほど培養検査より早く結果がでる。診断がつけばすぐに適切な抗菌剤の投与などの治療を開始できるため腸チフス・パラチフスの診断・治療という点において大いに貢献できると考えられる。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

廣瀬健二 伊藤健一郎 渡辺治雄

サイクリングプローブ法を利用したチフス菌・パラチフスA菌の *gyrA* 変異検出法の開発

##### 2. 学会発表 なし

#### G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1 リアルタイム PCR に使用したプライマーとプローブ

vipR-s	TTCAAGTTCGCgACTAATg	19mer
vipR-as	ATAATCTCTCTgCTCCgTCA	20mer
FAM-vipR-p	TTTCgATgCggCAA	14mer
fliCa-s	CTTCggCTACATTAAgCACT	20mer
fliCa-as	TATAgAATCCgCCTTTgTTg	20mer
FAM-fliCa-p	CCgATgCgACCgAT	14mer
fliCd-a	CgATAAaggACAATACTAg	18mer
fliCd-as	TAgCAgTAATTgCACCTg	18mer
FAM-fliCd-p	ATTgTggTggC	12mer
tyv-a	TgAAATAATTgAAgAggAAg	20mer
tyv-as	ATCAATCCCTTgACTTAAAg	20mer
FAM-tyv-p	TA $\square$ AAgCTTCATTT	14mer
ROX-para-p	TT $\square$ AAgCTTCATTT	14mer

プローブ中に□で囲ってあるところは RNA に置換したところを示す。

表2 反応条件

×10 Buffer	2.5 $\mu$ l
dNTP	3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
Primer Mix	0.3 $\mu$ l (15 $\mu$ M each Typhi-F1/R1)
Probe	0.5 $\mu$ l (10 $\mu$ M Typhi-Probe, FAM)
Probe	0.5 $\mu$ l (10 $\mu$ M Para-Probe, ROX)
Taq	0.25 $\mu$ l
RNaseH	0.5 $\mu$ l
dw	10.45 $\mu$ l
template	2 $\mu$ l

(Monoplex の場合は Probe1 種類、dw は 10.95  $\mu$ l)

95°C, 20s → (95°C, 15s; 55°C, 20s; 72°C, 15s, Optical ON) 40 サイクル

表3 リアルタイムPCRによるチブス菌・パラチブスA菌の同定

Strain No.	O	HI	H2	vipR	fliC-d	O9 fyv	O2 parat	fliC-a
990116	<i>Salmonella</i>	Typhi		16.97	16.21	20.31	-	-
990120	<i>Salmonella</i>	Typhi	-	17.74	17.17	20.83	-	-
990006	<i>Salmonella</i>	Typhi	-	16.75	16.32	20.12	-	-
990007	<i>Salmonella</i>	Typhi	-	17.5	16.98	20.72	-	-
990035	<i>Salmonella</i>	Typhi	-	16.12	15.65	19.63	-	-
980111	<i>Salmonella</i>	Typhi	-	23.04	22.59	27.99	-	-
980077	<i>Salmonella</i>	Typhi	-	23.72	23.76	28.91	-	-
980014	<i>Salmonella</i>	Typhi	-	18.31	19.08	22.24	-	-
000055	<i>Salmonella</i>	Paratyphi A		-	-	-	29.52	25.99
990110	<i>Salmonella</i>	Paratyphi A		-	-	-	30.22	26.55
960007	<i>Salmonella</i>	Paratyphi A		-	-	-	28.61	25.13
000001	<i>Salmonella</i>	Paratyphi A		-	-	-	29.98	26.84
990081	<i>Salmonella</i>	Paratyphi A		-	-	-	30.33	27.18
990046	<i>Salmonella</i>	Paratyphi A		-	-	-	30.81	27.8
T122	<i>Salmonella</i>	Paratyphi A		-	-	-	24.4	20.6
99023	<i>Salmonella</i>	Chester	e,h	-	-	-	-	-
99076	<i>Salmonella</i>	Agona	f,g,s	-	-	-	-	-
99026	<i>Salmonella</i>	Oranienburg	m,t	-	-	-	-	-
99063	<i>Salmonella</i>	Infantis	r	-	-	-	-	-
99087	<i>Salmonella</i>	Litchfield	l,v	-	-	-	-	-
99114	<i>Salmonella</i>	Hadar	z10	-	-	-	-	-
99109	<i>Salmonella</i>	Enteritidis	[f],g,m,[p]	-	-	22.52	-	-
99112	<i>Salmonella</i>	Javiana	1,z28	-	-	22.54	-	-
99017	<i>Salmonella</i>	Senftenberg	g,[s],t	-	-	-	-	-
99089	<i>Salmonella</i>	Grumpensis	d	-	20.85	-	-	-
99108	<i>Salmonella</i>	Poona	z	-	-	-	-	-
1498	<i>Salmonella</i>	Strauburg	d	-	21.92	24.53	-	-
1499	<i>Salmonella</i>	Durban	a	-	-	21.4	-	22.83
1500	<i>Salmonella</i>	Ndolo	d	-	-	-	-	-
Y-101	<i>Yersinia</i>	enterocolitica	O9	-	-	-	-	-
Y-102	<i>Yersinia</i>	pseudotuberculosis	1b	-	-	-	-	-
Y-103	<i>Yersinia</i>	pseudotuberculosis	4b	-	-	-	-	-

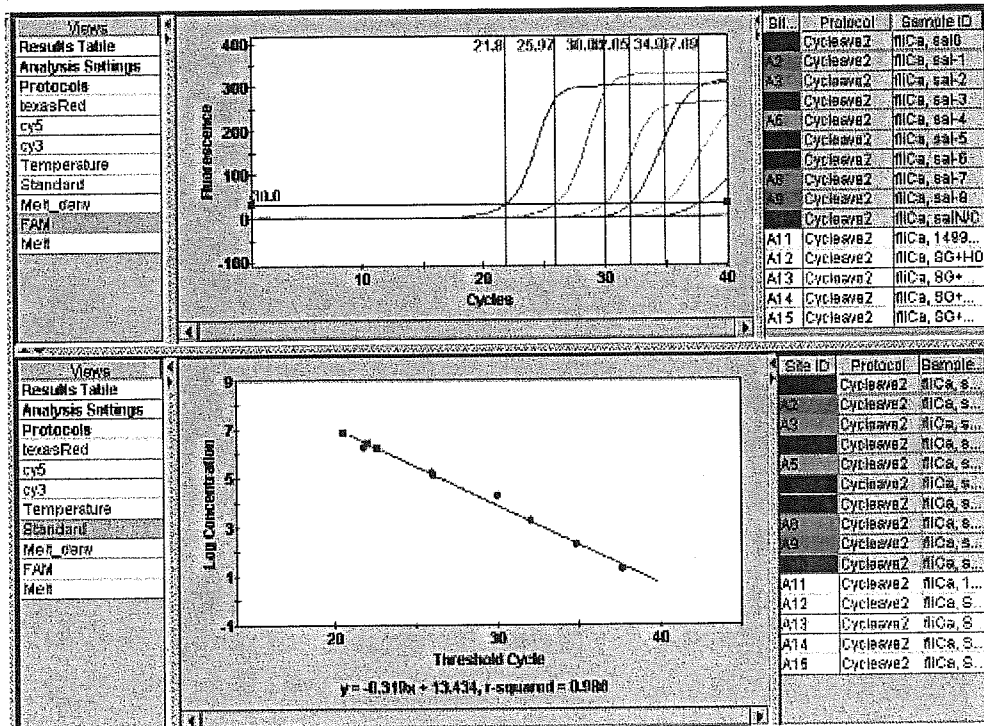
Y-104	<i>Yersinia</i>	<i>pseudotuberculosis</i>	5b	-	-	-	-	-
1349	<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i>	O1	-	-	-	-	-
1350	<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i>	O1	-	-	-	-	-
1351	<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i>	O139	-	-	-	-	-
1352	<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i>	NAG	-	-	-	-	-
1354	<i>Vibrio</i>	<i>parahemolyticus</i>		-	-	-	-	-
1356	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>		-	-	-	-	-
1360	<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i>	2a	-	-	-	-	-
1362	<i>Shigella</i>	<i>sonnei</i>		-	-	-	-	-
1366	<i>E.coli</i>	ETEC	O25	-	-	-	-	-
1303	<i>E.coli</i>	EHEC	O157	-	-	-	-	-
1223	<i>E.coli</i>	EPEC	O157	-	-	-	-	-
pas1	<i>Bacillus</i>	anthracis		-	-	-	-	-

数値はプローブの蛍光が検出され始めたサイクル数を表す

表4 菌量と検出サイクル数

プライマー	菌量(CFU/tube)	サイクル数	
		生理食塩水	クエン酸血液
fliC-a	1750000	21.8	22.64
	175000	25.97	25.16
	17500	30.03	29.97
	1750	32.05	33.24
	175	34.9	35.63
	17.5	37.69	-
	1.75	-	-
	0.175	-	-
	0.0175	-	-

図1 菌量と検出サイクル数(上)、菌量と検出サイクル数の相関関係(下)



## 2. $\beta$ -ラクタム剤に対する耐性度が低下した変異株を生じる肺炎球菌の解析

小児咽頭から分離された肺炎球菌は継代によりコロニーの形態が異なる変異株を約 1/100 の高確率で生じた。またこのコロニー形態の変化に伴いペニシリン G の MIC が 8  $\mu\text{g/ml}$  から 2  $\mu\text{g/ml}$  に低下した。蛍光ペニシリンをもちいた競合 PBP アッセイでは両者の複数のペニシリン結合蛋白の結合性に差は見られず、それらの遺伝子 *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* に同じ変異が観察された。両者で莢膜の厚さに差があることが観察されたがこれがペニシリンの感受性の差の原因であるかどうかは不明である。

肺炎球菌は、呼吸器感染症の主要な起炎菌であるばかりでなく中耳炎、敗血症、髄膜炎の起炎菌としても重要であり、この菌の  $\beta$ -ラクタム剤に対する耐性度の上昇は治療上の問題となっている。この耐性は主として細胞壁を合成するペニシリン結合蛋白(PBP)の変異によるものであるが、類似した PBP 遺伝子変異を持つ菌が異なる耐性度をしめす場合があり(1)、 $\beta$ -ラクタム剤に対する高度耐性化には PBP 遺伝子以外のどのような変異が必要なのか、詳細は不明のままである(2)。今年の研究では、小児の咽頭から分離されたペニシリン高度耐性肺炎球菌の解析をおこなった。

【方法】菌は、都内病院の小児科外来を受診した患者の咽頭ぬぐい液から分離された。患者に炎症所見はなく、再来が得られなかったため、その後のフォローはできていない。

菌の培養にはヒツジ血液寒天 EX (Nissui)をもちいた。MIC は、CLSI (NCCLS) M7-A6, M100-S15 に準拠し(37°C, 22 h, 大気)、ドライプレート

(栄研化学)をもちいて測定した。血清型は Statens Seruminstitut の群別ならびに因子血清をもちいて膨潤法により判定した。

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) では、*SmaI*, *SacII*, *BssHIII*, *EagI*, *NarI*, *ApaI* を用いてゲノム DNA を消化後、1-15 sec 毎に泳動の向きを変えながら、15 時間泳動をおこなった。コントロールとして、血清型 19F の他の臨床分離株との比較もおこなった。

競合 PBP アッセイのために、マイクロビーズ法により菌体を破碎して調製した膜画分をもちい、これと、蛍光ラベルペニシリン (Bocillin FL, Molecular Probe) および非ラベル PCG の反応性を測定した。PBP 遺伝子の塩基配列解析のために、PBP1a, PBP2x, PBP2b の遺伝子 *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* の一部を PCR にて増幅し、その配列を決定した。

莢膜観察では、固定しない菌と墨汁を混合し、これを脱脂したスライドガラスとカバーガラスの間に滴下し、菌体



周辺の墨汁が排斥された様子を観察した。この観察にあたり、菌体をメチレンブルーで染色した。

【結果】分離株を血液寒天で培養したところ、扁平で内部が陥凹したタイプのコロニー(SP111)に混じり、厚みがあり中央部の陥凹がはっきりしないコロニー(SP112)を生じた。各々を血液寒天で継代すると、SP111からは再びSP112タイプのコロニーが約1/100の割合で形成されたが、SP112からはSP111タイプのコロニーが現れることはなかった。SP111とSP112はともに血清型19Fであった。

以下に感受性試験の結果を示す。

	SP111	SP112
PCG	8	2
ABPC	16	8
CTX	2	1
CPDX	≥8	2
CDTR	1	0.25
IPM	0.5	0.25
MEPM	1	0.5
PAPM	0.12	0.06
BIPM	0.5	0.5
EM	≥8	≥8
CLDM	≥8	≥8
TEL	0.5	0.5

(μg/ml)

同一菌株に由来し、異なるコロニーの形態を示すSP111とSP112はβ-ラクタム剤に対して異なる感受性を示した。SP111のPCGのMICが8 μg/mlであるのに対して、SP112のPCGのMICは2 μg/mlであった。また、他のβ-ラクタム剤に対してもSP111の方

がSP112に比べ1管から2管高いMICを示した。

この原因を調べる目的で、SP111とSSP112から膜蛋白を調整し、これに非ラベルPCGを反応させた後に蛍光ペニシリンを反応させる競合PBPアッセイを行った。蛍光ペニシリンによって検出されたPBPは最初の非ラベルペニシリンに反応しなかったPBPの量を反映している。

図1

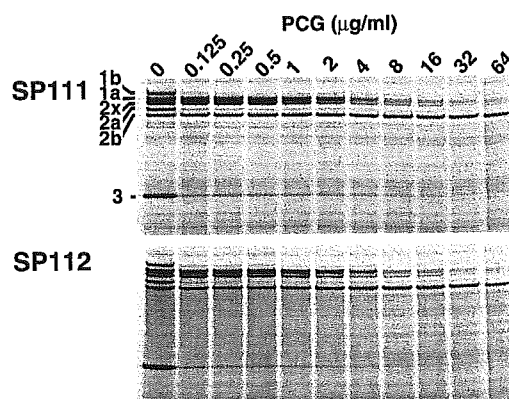


図1に示すようにSP111、SP112に共通してPBP1a, PBP2x, PBP2bに対するPCGの結合性の低下は見られたものの、SP111とSP112間で結合性に差は見られなかった。PCGに対して結合性の低下が見られたPBP1a, PBP2x, PBP2bの遺伝子*pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b*の配列を調べたところ、SP111, SP112に共通して以下のような耐性変異が見られた。

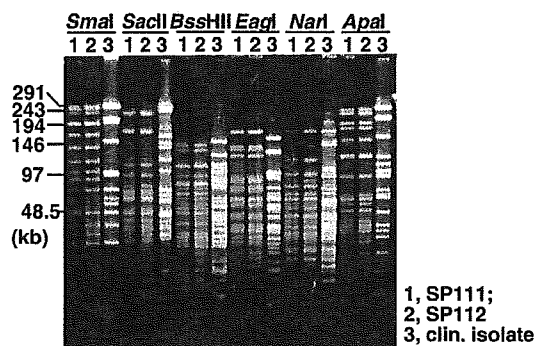
PBP1a: ST(371)MK->SSMK,  
SRNVP(432)->SRNVT;

PBP2x: ST(338)MK->SAMK;

PBP2b: YT(431)Q(432)A->YKLA,  
SSNT(451)->SSNA

両者のゲノムを比較する目的で、複数の制限酵素を用いた PFGE を行なったが、ゲノムパターンを区別することはできなかつた(図 2)。またプラスミド画分を調製したが、両者ともにプラスミドは保持していなかつた (data not shown)。

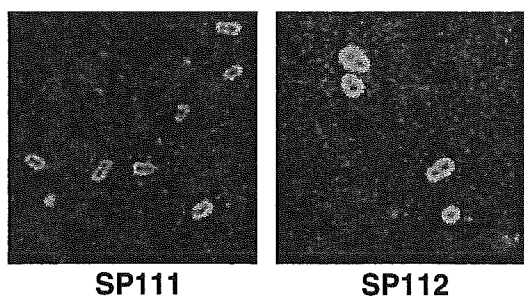
図 2



SP111 と SP112 では莢膜の厚さが異なることが観察されたが (図 3)、 $\beta$ -ラクタム剤により耐性な SP111 の方が SP112 より薄い莢膜を持っていた。

図 3

### Capsule of *S. pneumoniae*



【考察】PBP1a, PBP2x, PBP2b に SP111 や SP112 と同様な変異を持つ他の肺炎球菌は、PCG の MIC が 2  $\mu\text{g/ml}$  以上を示すことが報告されている (1)。この濃度は SP112 に対する PCG の MIC と同じである。SP112 と

同じ PBP 遺伝子の変異をもつ SP111 が PCG やそれ以外の  $\beta$ -ラクタム剤に対して、SP112 より高い MIC を示す原因は今回の研究で明らかにすることはできなかつた。細胞壁融解酵素遺伝子 *lytA* の発現量にも両者で差は見られなかつた (data not shown)。莢膜の厚さそのものが  $\beta$ -ラクタム剤感受性の差の原因であるかどうかは不明である。実際に、 $\beta$ -ラクタム剤と作用機序が異なり、莢膜、細胞壁、細胞膜を透過した後、細胞内で働く Telithromycin の MIC には両者で差が見られなかつた。また、ABPC の MIC が PCG よりも高い現象は PBP の変異だけから説明することはできず (2)、今後の解析が必要である。

### 【参考文献】

#### 参考文献

1. Y Sanbongi, T Ida, M Ishikawa, Y Osaki, H Kataoka, T Suzuki, K Kondo, F Ohsawa, M Yonezawa. Complete sequences of six penicillin-binding protein genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48:2244-2250.
2. M du Plessis, E Bingen, KP Klugman. Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46:2349-2357.

【論文発表】なし

#### IV. 班會議抄錄

平成17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(H15-新興-9)」

### 第1回班会議抄録

期日 : 平成17年11月25日(金)12:40-18:20

平成17年11月26日(土) 9:00-12:45

場所 : 森秋旅館 会議室 (群馬県北群馬郡伊香保町 60)