

複合体の構造を決定した。この結果から、VIM-2の有効な阻害剤の開発に当って亜鉛(II)に配位しloop1並びにloop2のアミノ酸残基と相互作用する置換基を有する阻害剤の分子設計が必要であることが本研究で明らかとなった。

### 研究発表論文

Jin, W., Arakawa, Y., Yasuzawa, H., Taki, T., Hashiguchi, R., Mitsutani, K., Shoga, A., Yamaguchi, Y., Kurosaki, H., Shibata, N., Ohta, M., and Goto, M. (2004) *Biol. Pharm. Bull.* **27**(6), 851-856

### 参考論文

1. Page, M. I. (1999) *Curr. Pharm. Des.* **5**(11), 895-913
2. Ambler, R. P. (1980) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **289**(1036), 321-331
3. Zervosen, A., Valladares, M. H., Devreese, B., Prosperi-Meys, C., Adolph, H. W., Mercuri, P. S., Vanhove, M., Amicosante, G., van Beeumen, J., Frere, J. M., and Galleni, M. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**(13), 3840-3850
4. Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., and Ohta, M. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**(7), 1612-1615
5. Park J. D., and H., K. D. (2002) *J. Med. Chem.* **45**(4), 911-918
6. Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F., and Kato, N. (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**(1), 71-78
7. Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J. D., and Nordmann, P. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(4), 891-897
8. Kurosaki, H., Yasuzawa, H., Yamaguchi, Y., Jin, W., Arakawa, Y., and Goto, M. (2003) *Org. Biomol. Chem.* **1**(1), 17-20
9. Terwilliger, T. C., and Berendzen, J. (1999) *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **55** (Pt 4), 849-861
10. Terwilliger, T. C. (2000) *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **56** (Pt 8), 965-972
11. Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr.* **A47**, 110-119
12. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr.* **D54**, 905-921
13. van Aalten, D. M., Bywater, R., Findlay, J. B., Hendlich, M., Hooft, R. W., and Vriend, G. (1996) *J. Comput. Aided Mol. Des.* **10**(3), 255-262
14. Goto, M., Takahashi, T., Yamashita, F., Koreeda, A., Mori, H., Ohta, M., and Arakawa, Y. (1997) *Biol. Pharm. Bull.* **20**(11), 1136-1140
15. Toney, J. H., Hammond, G. G., Fitzgerald, P. M., Sharma, N., Balkovec, J. M., Rouen, G. P., Olson, S. H., Hammond, M. L., Greenlee, M. L., and Gao, Y. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**(34), 31913-31918
16. Mollard, C., Moali, C., Papamicael, C., Damblon, C., Vessilier, S., Amicosante, G., Schofield, C. J., Galleni, M., Frère, J. M., and Roberts, G. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**(48), 45015-45023

## 緑膿菌の抗菌薬多剤耐性化に機能する排出システムの性状の解析 と簡便検出法の考案

分担研究者: 後藤 直正; 研究協力者: 門野愛美、尾崎 徹  
京都薬科大学・微生物学教室

緑膿菌の染色体上の多剤排出システムオペロンの発現は、抗菌薬耐性や病原性の発揮に寄与する。本年度の研究によって次の成果を得た。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の排出する。この結果、*mexCD-oprJ* 発現株では染色体性 AmpC  $\beta$ -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。2) *mexAB-oprM* 高発現株の検出法を開発し、臨床分離株に適応したところ、*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。

### A. 研究目的

異物(抗菌薬)排出システムは生物界に広く分布し、環境中に存在する有機溶媒、重金属、細胞障害性化合物などの有害な化学物質や Quorum sensing に関与する化合物などの細胞代謝産物などをエネルギー依存的に細胞内から細胞外へ能動輸送(排出)する。細菌では主に抗菌薬を細胞外に排出する結果、抗菌薬耐性をもたらす抗菌薬排出システムの研究が現在までに行われてきた。細菌の排出タンパク質はその相同性と利用するエネルギー種から少なくとも 5 つのファミリーに分類されているが、ATP 駆動型排出タンパク質は数種のもが発見されているに過ぎず、ほとんどが、細胞膜の内外に形成されたプロトン(H<sup>+</sup>)勾配によるプロトン駆動力型である。

緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は院内感染症の原因菌として分離頻度の高いグラム陰性細菌である。本菌感染症は難治化す

ることが多く、その治療が困難な原因の一つは、本菌が種々の抗菌薬や消毒剤に高い抵抗性を示す点にあり、この原因のひとつが RND マルチコンポーネント型多剤排出システム(Mex システム)群の機能にあることが示唆されてきた。本システムの発現は構造的に類似性の無い多種の抗菌薬に対する耐性化に関与する。また緑膿菌のゲノム解析は、既知のものも含めて 12 種の RND 型多剤排出システムが染色体上にコードされていることを示唆している。

このように Mex システムの発現は緑膿菌に抗菌薬耐性を付与するが、Mex システムのひとつをコードする *mexCD-oprJ* の発現株では、キノロン薬、一部のベータラクタム薬、マクロライドやテトラサイクリンなどに対する耐性が観察されるが、奇妙なことに imipenem などのカルバペネムに対する高感受性化も観察される。メカニズムは不明であるが、*mexCD-oprJ* の発現によって imipenem などによる染色体性

AmpC  $\beta$ -lactamase の誘導能が低下することが原因であると考えられてきた。そこで、このメカニズムを解明することによって Mex システムの新たな機能を見出すことを試みた。

また、抗菌薬耐性緑膿菌の出現は本菌感染症の治療の障害となっている。このような耐性菌の出現のサーベイランスやそれを基にした耐性菌抑制法の考案が希求されている。グラム陰性菌における抗菌薬耐性は、抗菌薬作用標的の変異による親和性の低下、抗菌薬分解または修飾酵素の産生、外膜透過性の変化および能動的排出などの少なくとも 4 種類の機構によって起こる。能動的排出はその基質域の広さから一種の抗菌薬のみならず、多剤耐性化を引き起こすことが問題である。本研究では緑膿菌で構成的に発現し、本菌の抗菌薬耐性に重要な役割を果たしている MexAB-OprM システムの簡便検出法を考案した。

## B. 研究材料と方法

1.  $\beta$ -lactamase 活性の測定: セファロチンを基質とした UV 法によって測定した。

2. 遺伝子欠損株の作成: すでに報告したようにクローン化した標的遺伝子中に欠失部分を作成し、その変異遺伝子を用いた相同的組換えにより、目的遺伝子を欠失させた。

3. ムロペプチドの蓄積量の測定: *Enterobacter cloacae* 由来の *ampR-ampC* オペロンを含むプラスミドと *P. aeruginosa* 由来の *mexCD-oprJ* オペロンを含むプラスミドを保持した *E. coli* 細胞を [<sup>3</sup>H]diaminopimelate を含む培地中で培養することによって、細胞壁ペプチドグリカンを標識した。その後、imipenem などの抗菌薬の作用によって遊離したムロペプチドの量を放

射活性の強さで比較した。

4. Mex システム簡便検出法: 希釈した試験株を培養液を寒天平板培地上に塗抹した。その平板上に、市販のレボフロキサシン・ディスクと Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide 塩酸 (ジアミン EPI) を含む紙製ろ紙を貼り付けた。培養後に形成されたレボフロキサシン・ディスクの阻止円の形成に与えるジアミン EPI ディスクの影響を観察した。

## C. 結果および考察

1. 多剤排出システム MexCD-OprJ の発現による AmpC  $\beta$ -lactamase 産生の抑制機構の解析

*P. aeruginosa* の  $\beta$ -lactamase 誘導産生機構がグラム陰性菌と同様であることを確認した。また、*nfxB* 変異株における  $\beta$ -lactamase 活性の減少は *nfxB* 遺伝子の変異によるものではなく、*nfxB* 変異の結果もたらされた *mexCD-oprJ* の発現によるものであることを確認した。

細胞内ムロペプチド蓄積量の測定は *Escherichia coli* 細胞で実験を行った。その結果、*mexCD-oprJ* の発現によりムロペプチド蓄積量の減少が観察され、同時に、*mexCD-oprJ* の発現により  $\beta$ -lactamase 活性の低下が観察された。これらのことから *mexCD-oprJ* は細胞内に蓄積したムロペプチドを排出することにより、 $\beta$ -lactamase 活性の低下を引き起こすことが明らかとなった。さらに *P. aeruginosa* 細胞での *nagZ* の高発現は、*mexCD-oprJ* の発現による  $\beta$ -lactamase 産生の抑制を解消させることが分かった。これは *mexCD-oprJ* の発現によって GlcNAc-1,6-anhMurNAc pentapeptide が排出されることを示唆している (Fig. 1)。

今回の研究により MexCD-OprJ は抗菌薬や消毒薬の排出のみならず、ムロペプチドという自己代謝産物をも排出するという生理的な機能を持つことを明らかにすることができた。さらにはムロペプチドの中でも 1,6-anhMurNAc pentapeptide ではなく GlcNAc-1,6-anh-MurNAc pentapeptide を排出していることが

GlcNAc-1,6-anhMurNAc pentapeptide を排出していることが推測されたことから、MexCD-OprJ の基質認識に N-アセチルグルコサミン残基が非常に重要であることが示唆された。この情報は排出システムに排出される基質の特徴解明や、排出システム阻害薬の創製に有益な情報であると考えられる。

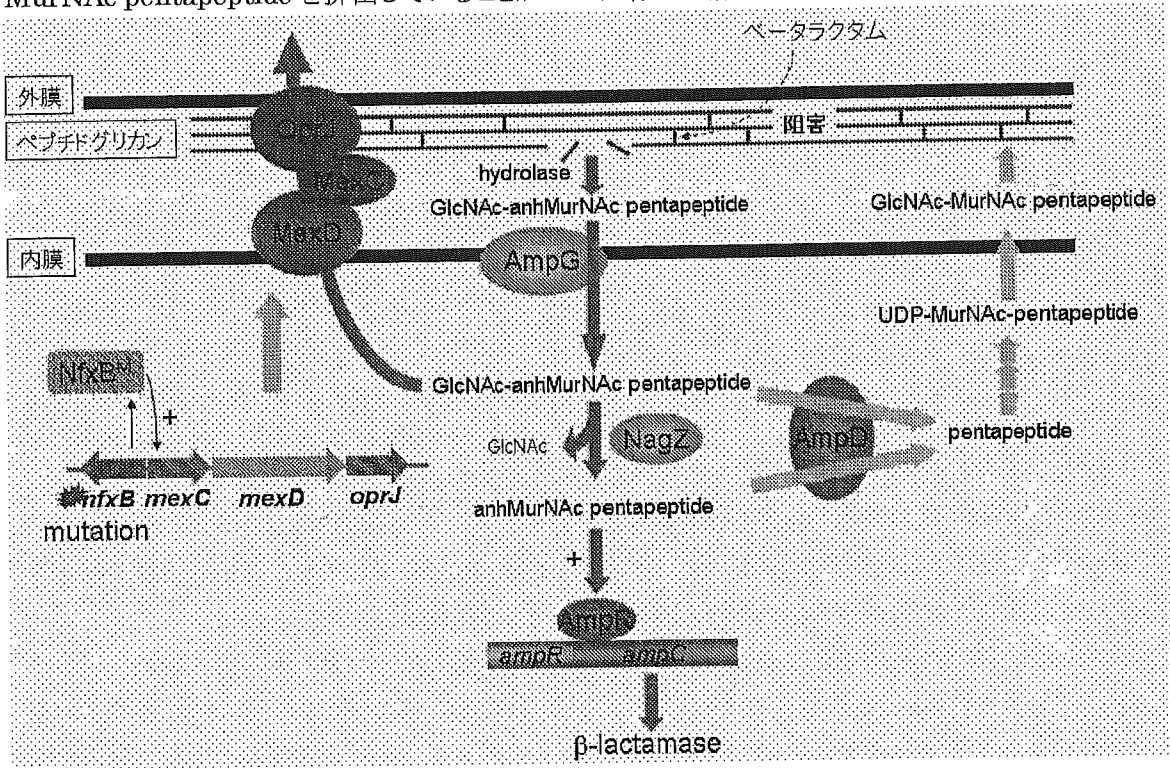


Fig. 1. MexCD-OprJ によるβ-lactamase 産生抑制モデル

推測されたことから、MexCD-OprJ の基質認識に N-アセチルグルコサミン残基が非常に重要であることが示唆された。この情報は排出システムに排出される基質の特徴解明や、排出システム阻害薬の創製に有益な情報であると考えられる。今回の研究により MexCD-OprJ は抗菌薬や消毒薬の排出のみならず、ムロペプチドという自己代謝産物をも排出するという生理的な機能を持つことを明らかにすることができた。さらにはムロペプチドの中でも 1,6-anhMurNAc pentapeptide ではなく

## 2. 抗菌薬排出システム MexAB-OprM 発現の簡便検出法の考案

本方法で MexAB-OprM の発現量の異なる実験室株を用いて阻止帯形成を観察したところ、MexAB-OprM の発現を簡便に検出することが可能であることが示唆された。そこで抗菌薬感受性が異なる 104 株の臨床分離 *P. aeruginosa* で本方法の実用性を試験したところ、MexB の高発現がなくても阻止帯の延長が観察された株も認められた。この原因を、定量的 RT-PCR 法やウェスタンイムノブロット法

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  $\beta$ -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、臨床分離株に適応したところ、*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

ーバ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., Yamamoto, 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  $\mu$ 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  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$ -lactamase: ESBL) は  $\beta$  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  $\beta$  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、DHL 寒天上にも乳糖を分解する菌株が

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  $\mu$ 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)
<b>PCR primer sets of <math>\beta</math>-lactamase</b>			
CTX-M-2	sense	GCGAACAGCGTGCAACAGCAGCTGG	521
	antisense	GCCAGCGCTTTACCCAGCGTCAG	
CTX-M-3	sense	GAGCATATGGTTAAAAAATCACTGCGTCAGTTC	891
	antisense	CAGGGATCCTTACAAACCGTCGGTGACGATTTTAGCC	
CTX-M-9	sense	GTTTGAGCATATGTTGACAAAGAGAG GCAACGG	895
	antisense	CAGGGATCCTTACAGCCCTTCGGCGATG	
TEM	sense	GGGGAGCTCATAAAATTCCTGAAGAC	1199
	antisense	GGGGATCCTTACCAATGCTTAATCA	
SHV	sense	G TTCATATGCGTTATATTCGCCTGTG	876
	antisense	ATAGGATCCTTAGCGTTGCCAGTGCT	
<b>Sequence primer for CTX-M-18</b>			
	sense	AGAGAGTGCAACGGATGATGTT	
	sense	GTTGCAGTACAGCGACAATACC	
	sense	GCTGGTTCTGGTGACCTATTTTAC	
	antisense	GCCATAACTTTACTGGTACTGCAC	
	antisense	CTGGGTAAAATAGGTCACCAGAAC	

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  $\beta$ 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  $\beta$ 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、外来にてラクトミン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  $\beta$ -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- $\beta$ -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*<sub>1</sub>) 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*<sub>1</sub>) 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：サルモネラが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  $\beta$ -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,Tp 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 $\beta$ -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 SG11 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 SG11 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 SG11 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 $\beta$ -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 $\beta$ -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

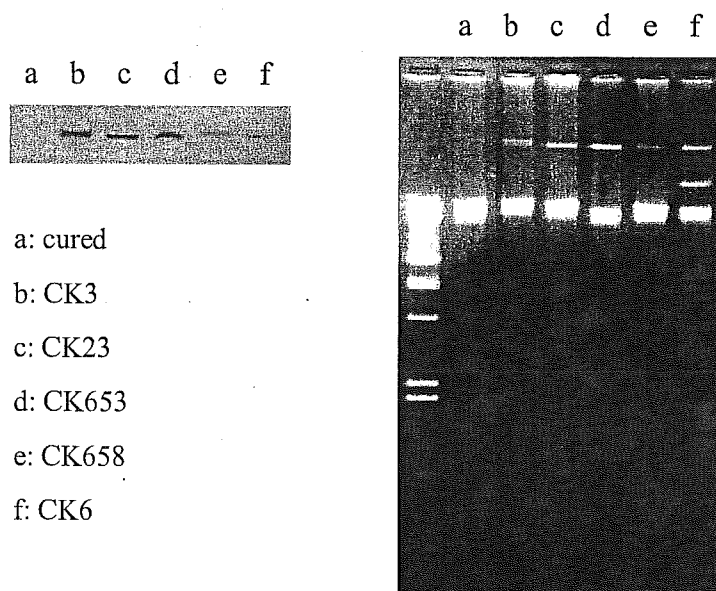
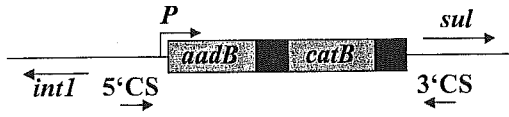


図 1 Plasmids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium OXA-1 producers

**In-t1: 2.0 kb**

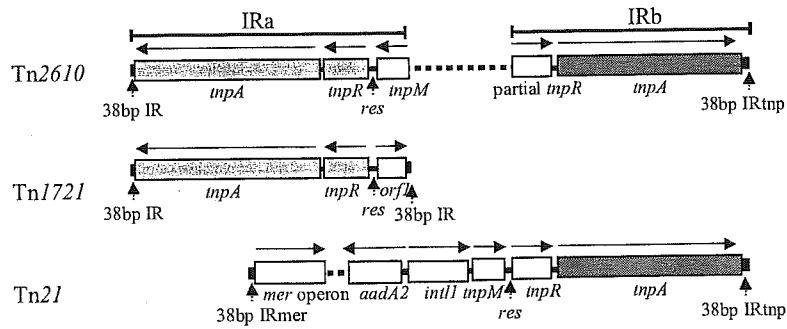


**In-t1: 1.5 kb**

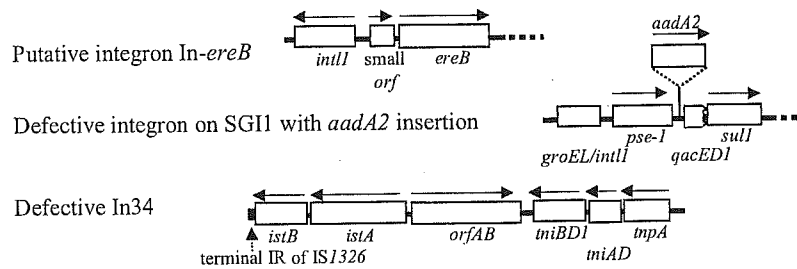


⊗ 2 Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI plasmid in *S. enterica* serovar Typhimurium

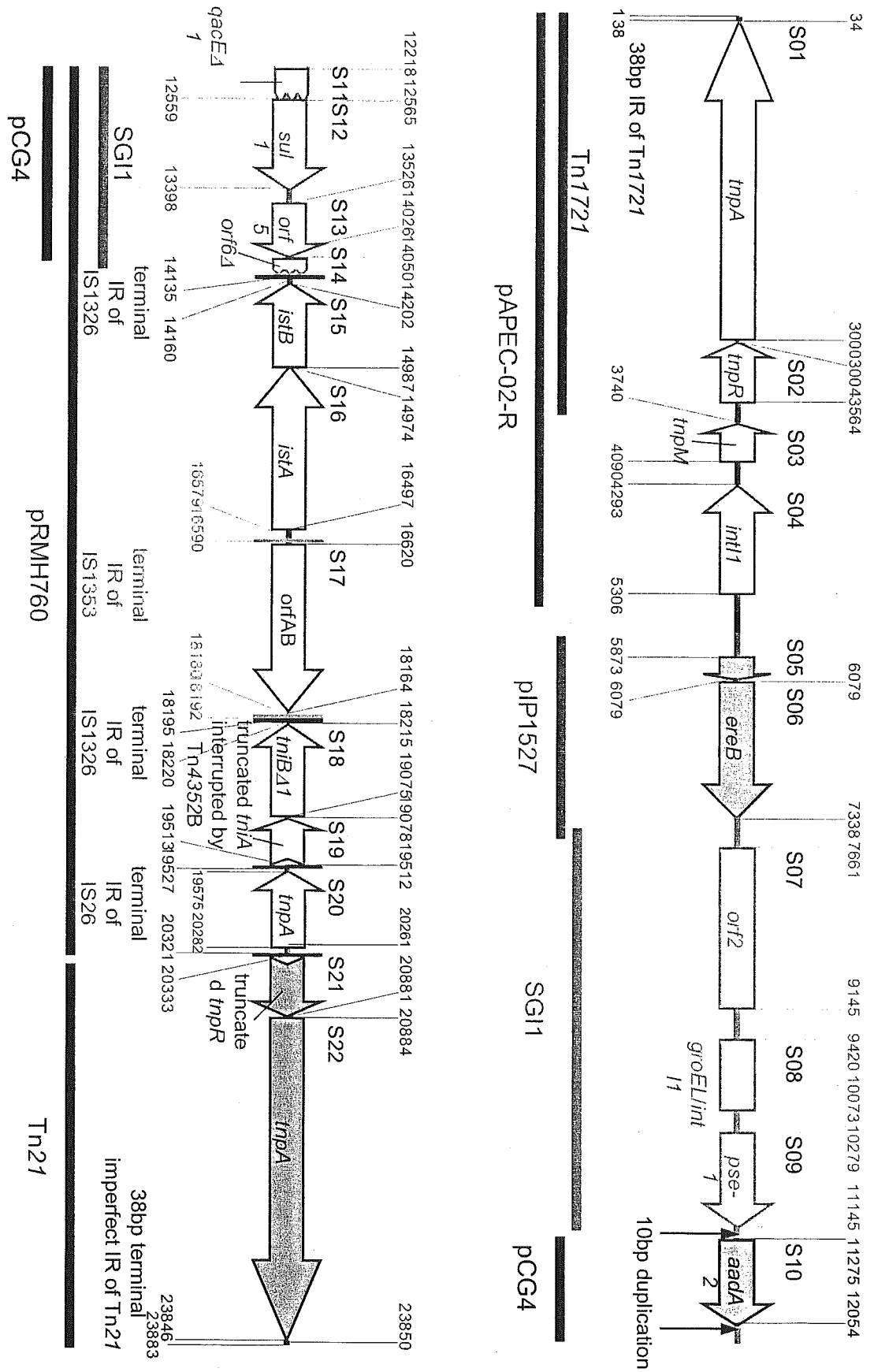
(A) Transposition Modules



(B) Defective Integrons



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



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. *Anitmicro. 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 Genimics 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

		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	F3/R2	F3/R3											
gyrAF primer	20mer	g	g	A	C	T	A	A	T	C	g	T	A	A	A	T	A	C				
gyrAF-2 primer	19mer	g	T	A	A	T	C	g	T	A	A	A	T	A	C	C	A	T	C			
gyrAF-3 primer	18mer	g	T	C	g	T	T	g	T	g	A	C	g	T	A	A	T	C				
gyrAR primer	19mer	C	g	A	A	g	T	T	A	C	C	C	T	g	A	C	C	A	T	C		
gyrAR-2 primer	18mer	C	A	A	T	A	g	A	A	C	C	g	A	A	g	T	T	A	C			
gyrAR-3 primer	19mer	C	C	g	T	C	A	A	T	A	g	A	A	C	C	g	A	A	g			
Wild 83 probe	11mer	T	g	C	g	(g)	A	A	T	C	g	C	5'末端 FAM、3'末端 Eclipse 標識	○	○							
Mutant 83(TTC) probe	11mer	T	g	C	g	(A)	A	A	T	C	g	C	5'末端 FAM、3'末端 Eclipse 標識	○	○	○	○				○	
Mutant 83(TAC) probe	11mer	C	T	g	C	(g)	T	A	A	T	C	g	5'末端 ROX、3'末端 Eclipse 標識	○	○	○	○				○	
Mutant 83(TAC) probe-2	11mer	T	g	C	g	(A)	A	T	C	g	C	5'末端 ROX、3'末端 Eclipse 標識	○	○	○	○				○		
Wild 87 probe	12mer	T	A	T	(g)	A	C	A	C	C	A	T	C	5'末端 ROX、3'末端 Eclipse 標識	○	○						
Wild 87 probe-2	11mer	T	g	T	A	T	(A)	C	A	C	C	5'末端 ROX、3'末端 Eclipse 標識	○	○								
Mutant 87(TAC) probe	11mer	T	g	T	A	T	(A)	C	A	C	C	5'末端 FAM、3'末端 Eclipse 標識							○			
Mutant 87(AAC) probe	11mer	T	g	T	A	T	(A)	C	A	C	C	5'末端 ROX、3'末端 Eclipse 標識					○	○				
Mutant 87(ggC) probe	11mer	T	g	T	A	T	(g)	C	A	C	C	5'末端 FAM、3'末端 Eclipse 標識					○	○			○	

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

10X CycleavePCR Buffer	2.5 $\mu$ l
dNTP mixture (2.5mM each)	3 $\mu$ l
Mg solution (25mM)	5 $\mu$ l
Forward primer (4 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Reverse primer (4 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
各 Probe	1 $\mu$ l
RNase H	0.5 $\mu$ l
Ex taq	0.25 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	9.75 $\mu$ l
Total	25 $\mu$ 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)