

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 の増殖が起こっ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。

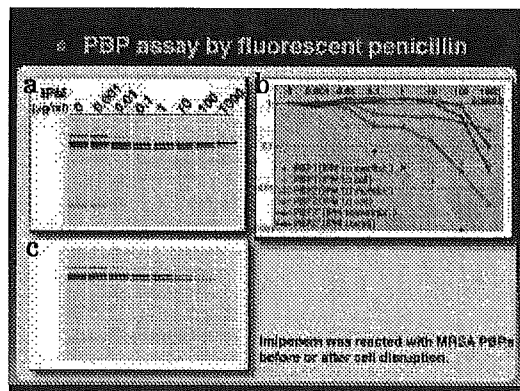
【対象と方法】 MSSA として NCTC8325 由来の BB255、MRSA として COL をもちいた。対数増殖期の菌体にあらかじめ、イミペネム (0.001 μ g/ml-1000 μ g/ml) を 30°C, 15 分反応させ、PBS で 3 回洗浄後、マイクロピーズを用いて菌体を破碎した。ここから調整した膜画分中の蛋白に対し、蛍光ペニシリン (10 μ M Bocillin FL, Molecular Probe 社) を反応させ、上記条件でイミペネムと反応しなかった PBP を検出した。PBP シグナル

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】破砕して得た膜画分に対してではなく、破砕前の COL 全菌体にイミペネムを反応させると、0.1 µg/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 µg/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)。

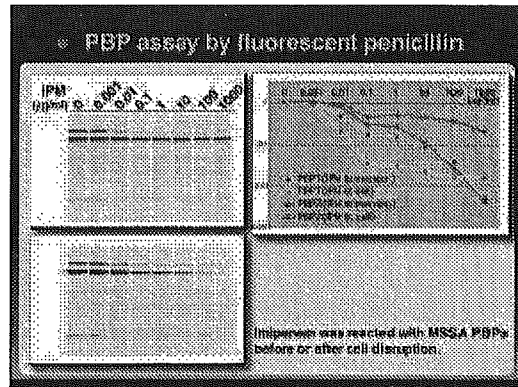
Figure 1



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、菌体破砕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

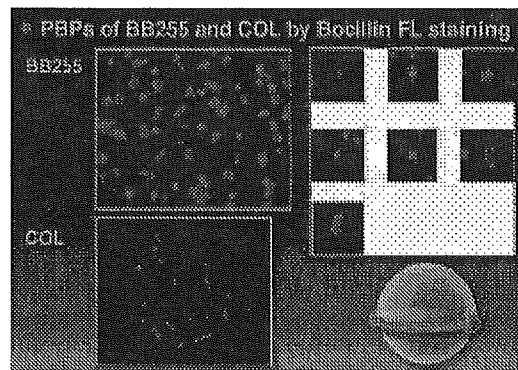
もつ PBP2' 以外には観察されない (Fig. 1c)。MSSA である BB255 の PBP1, PBP2 に対しておこなったアッセイでも同様な現象が観察された (Fig. 2)。

Figure 2



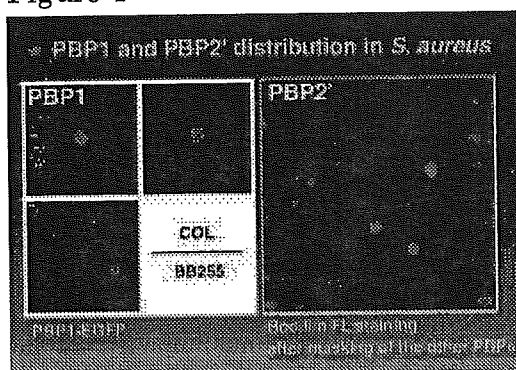
Bocillin FL を BB255 ならびに COL と反応させ、菌体表面の PBP を蛍光シグナルとして捉えると、PBP は菌体表面にうすく均一に分布するだけではなく、菌体を取り巻くリング状にも集積していることがわかる。これは、MSSA においても、MRSA においても同じであった (Fig. 3 左上下パネル)。このリングの作る面に一致して、隔壁が作られることが、分裂の異なる時期の菌体像を比較することによりわかる (Fig. 3 右上パネル)。

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

Ⅲ. 班會議抄錄

研究班研究打合せ会議

本研究班において薬剤耐性菌の全国調査等を行っている国立感染症研究所細菌第二部および群馬大学大学院医学系研究科細菌感染制御学の研究班員および研究協力者が、本年度の研究計画について第 77 回日本細菌学会総会会場の一室において研究打合せを行った。

会場：大阪国際会議場

日時：平成 16 年 3 月 31 日 (17:00~18:30) ~平成 16 年 4 月 1 日 (17:00~18:30)

国立感染症研究所 細菌第二部¹

荒川 宜親¹ 研究総括

山根 一和¹ 16S rRNA メチラーゼ保有菌株の全国調査：16S rRNA メチラーゼはアミノグリコシド産生放線菌が自己を保護するため産生し、高度アミノグリコシド耐性を付与する。2003 年に高度アミノグリコシド耐性グラム陰性桿菌から 3 種類 (*rmtA*, *rmtB*, *arma*) の 16S rRNA メチラーゼが報告された。全国からアミノグリコシド耐性グラム陰性桿菌を収集し、3 種類の耐性菌の調査研究をする。

小澤 良之¹ 結核菌の薬剤耐性菌の研究

柴山 恵吾¹ ヘリコバクターピロリのマクロライド耐性：*pylori* の CAM 耐性はほとんどの場合、23S rRNA 遺伝子の 2142 番目、または 2143 番目の塩基の point mutation による。ところで、*H. pylori* 感染においては、しばしば変異を持つ耐性株と、変異を持たない感性株が同時に存在することが報告されている。患者の胃内でマクロライド非存在下において、耐性株と感性株の割合が長期的にどのように推移していくのかについて研究する。

鈴木 里和¹ ESBL 産生菌による院内感染の疫学解析：ESBL 産生株による院内感染は 1990

年代はじめごろから欧米諸国を中心に報告されていた。わが国においては数年前より臨床からの ESBL 産生菌分離が増加しており、それに伴い院内感染事例が報告されるようになった。一方わが国での ESBL 産生菌による院内感染事例は調査報告が少ないため、その実態が十分に把握されていない。ESBL 産生菌による院内感染に際し、わが国の実情に基づいた対策を提案するため実態把握の調査研究を行う。

和知野 純一¹ 第4世代セフェム系抗菌薬耐性を付与する *Serratia marcescens* の染色体性 AmpC の解析: 16s rRNA methylase のメチル化部位の決定: 16s rRNA methylase は 16s rRNA をメチル化することにより、アミノグリコシド耐性を付与する。現在までに rmtA、rmtB、armA の3種類がグラム陰性桿菌より同定されている。今回は RmtA に関して、メチル基の取り込み、メチル化の部位の決定等詳細な解析を行う予定である。

群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学²、同 薬剤耐性菌実験施設³

池 康嘉^{2,3} 全国調査で分離された VRE の細菌学的研究と研究総括

藤本 修平² 院内感染対策サーベイランスの効率化に関する研究: 院内感染対策サーベイランスの効率化に必要な電算化のための基盤研究として、データ交換のための標準化、データ解析のための自動化技術の開発を行う。

谷本 弘一³ 輸入鶏肉汚染薬剤耐性菌の調査研究: グラム陰性菌 (大腸菌、サルモネラ菌等) の β -ラクタム剤耐性、キノロン耐性菌の分離と耐性機構を研究。

野村 隆浩² 輸入鶏肉由来 VRE の調査研究及び市場販売されている食肉 (鶏肉、豚肉、牛肉) の薬剤耐性菌による汚染の調査研究。関東地方のスーパーマーケット等で販売されている食肉を対象とする。

井上 貴子² 日本で最初の院内感染病院 VanB VRE のプラスミド解析: VanB VRE の接合伝

達性プラスミドを分離し、その遺伝子構造解析、病原性因子の遺伝学的解析を行う。

戸所 大輔² 日本で分離された VanB 型 VRE の耐性遺伝子解析：VanB 遺伝子の遺伝子構造の解析を行う。

平成16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)」

第一回 班会議抄録

日時 : 平成16年11月12日(金)12:40-18:20

平成16年11月13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)

プログラム

平成16年11月12日(金)

1. プラスミド性 AmpC β -lactamase の多量産生機構の解析

中野 竜一、長野 則之、前山 佳彦、石川 直人、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)

2. セフェピムを分解する CMY 型 AmpC β -ラクタマーゼの解析

○和知野 純一^{1,2}、山根 一和¹、柴田 尚宏¹、池 康嘉²、荒川 宜親¹
(国立感染症研究所 細菌第二部¹、群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学²)

3. 黄色ブドウ球菌 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)

4. 日本国内におけるチフス菌・パラチフス A 菌の分離状況

廣瀬 健二、渡邊 治雄
(国立感染症研究所 細菌第一部)

5. サルモネラ DT104 の多剤耐性領域を含むトランスポゾン Tn2610 の構造解析

高屋 明子¹、友安 俊文¹、渡邊 正人²、○山本 友子¹
(千葉大学大学院薬学研究院・微生物薬品化学¹、山之内製薬・微生物研究所²)

6. 我が国における VRE の分離状況および遺伝子型に関する調査研究

○富田 治芳¹、荒川 宜親²、芹川 武大³、長沢 光章⁴、藤本 修平¹、谷本 弘一⁵、野村 隆浩¹、池 康嘉^{1,2}
(群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学¹、国立感染症研究所 細菌第二部²、新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞医学専攻 細胞機能講座生殖医学病態解析学分野³、防衛医科大学校病院 検査部⁴、群馬大学大学院医学系研究科 附属薬剤耐性菌実験施設⁵)

平成16年11月13日(土)

7. 我が国における CTX-M-型 β -ラクタマーゼの分布調査

○柴田 尚宏、黒川 博史、鈴木 里和、和知野 純一、山根 一和、荒川 宜親
(国立感染症研究所 細菌第二部)

8. メタロ- β -ラクタマーゼ(IMP-1)への非可逆的阻害剤の作用機構

○黒崎 博雅¹、山口 佳宏¹、(故)後藤 正文¹、荒川 宜親²
(熊本大学大学院医学薬学研究部¹、国立感染症研究所 細菌第二部²)

9. 型の異なる複数の β -ラクタマーゼを同時に産生する株の識別法

○荒川 宜親、和知野 純一、八木 哲也、柴田 尚宏、山根 一和、鈴木 里和
(国立感染症研究所 細菌第二部)

10. 緑膿菌の多剤耐性に働く抗菌薬排出システムの性状と発現検出法

後藤 直正
(京都薬大・微生物)

11. 成人・耳鼻科感染症由来の検体を用いた PCR による原因菌の迅速検索と耐性遺伝子の解析

生方 公子、諸角 美由紀、長谷川 恵子、小林 玲子
(北里大学北里生命科学研究所, 感染情報学研究室)

プラスミド性 AmpC β -lactamase の多量産生機構の解析

北里大学大学院 医療系研究科 環境感染学

中野竜一、長野則之、前山佳彦、石川直人、岡本了一、井上松久

【目的】プラスミド性 AmpC β -lactamase を産生する腸内細菌群が特に海外で様々報告され、治療を困難にさせ問題となっている。本研究室に於いてペニシリン・セフェム系薬に耐性を示す臨床分離株より接合伝達可能なプラスミドにコードされた AmpC β -lactamase を幾つか検出した。いずれも高い酵素産生量を示しているため、そのうち *Citrobacter freundii* 由来とされる CMY-4 (*ampR* 欠損型) と CFE-1 (*ampR* 保有型) についてその高度耐性化に関わる発現調節機構を解明することを目的とした。

【方法】(1) 全てのプラスミド、サブクローンは大腸菌に形質転換し、MIC 測定を NCCLS 法に従い行った。(2) β -lactamase の酵素活性は UV 法にて検討した。(3) 定法に従い *bla*_{CMY-4} と *C. freundii* が本来保有するプロモーター領域を含むクローン pKU642、その上流にある *ISEcp1* の一部までを含むクローン pKU643 を作製した。(4) CMY-4 の転写活性を検討するためにプロモーター領域をプラスミド pGL3-basic (Promega) にサブクローニングし、Luminometer で Luciferase 活性を測定した。(5) CFE-1 の *ampR* に Transposon を挿入することによりその機能を不活性化させた。これに対し、CFE-1 の *ampR* (135Ala) をクローニングしたもの、CFE-1 と一塩基の違いのある *C. freundii* GC3 の *ampR* (135Asp) をクローニングしたものをそれぞれ共存させ、MIC、酵素活性を測定した。

【結果】(1) CMY-4 の CET に対する MIC 及び酵素活性はそれぞれ *E. coli* ML4947/pKU642; 32 μ g/ml、0.05Unit/mg、*E. coli* ML4947/pKU643; >256 μ g/ml、1.23Unit/mg であった。(2) CMY-4 の luciferase 活性を測定すると *ISEcp1* の一部(挿入されたプロモーター領域)を含むものは *C. freundii* 本来のプロモーター活性より約 20 倍転写活性が高いことが分かった。(3) CFE-1 の *ampR* を欠損させることにより CPDX の MIC が 32 に下がり、CFE-1 の *ampR* を共存させることにより 128 まで復帰していた。一方、*C. freundii* GC3 の *ampR* を共存させたとき MIC が 4 に抑えられていた。このことは他の薬剤に於いても同様の値を示した。

【考察】*C. freundii* 由来とされる CMY-4 には調節遺伝子である *ampR* が上流に存在せず、*ISEcp1* によって置換されている。*E. coli* ML4947/pKU642 の活性は低く保たれているが、*ISEcp1* を保有する *E. coli* ML4947/pKU643 は高い活性を示していた。このことより本来低い値を示す AmpC β -lactamase がプラスミド化する過程ではその調節遺伝子である *ampR* を欠損させ、強力なプロモーター (*ISEcp1* の一部領域) を獲得、認識することにより構成的に高度耐性を示すものと考えられる。CFE-1 は一塩基置換である *C. freundii* GC3 の *ampR* との比較から、その変異箇所 (135Ala) が *ampC* の転写活性に大きく関与していることが疑われる。プラスミド化の過程に於いて *ampR* が変異することによって高い酵素活性を得、優勢を示すことができたと推測される。これらプラスミド性 AmpC β -lactamase の高度耐性化には *ISEcp1* による強力なプロモーターの獲得、*ampR* の変異による転写活性化が大きな要因と考えられる。

セフェピムを分解する CMY 型 AmpC β -ラクタマーゼの解析

○和知野 純^{1, 2}、山根 一和¹、柴田 尚宏¹、池 康嘉²、荒川 宜親¹
(国立感染研 細菌第二部¹、群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学²)

【目的】一般にセフェピム(CFPM)は CMY-、DHA-、FOX-、型など現在までに報告されている多くのプラスミド性 AmpC β -lactamase に対し安定であり、これらを産生する菌に対してすぐれた抗菌活性を有する。我々は CFPM に耐性を示す *K. pneumoniae* より CFPM 分解能を有する CMY 型 β -lactamase を同定したのでその解析を行った。

【対象と方法】1施設より分離されたセファロスポリン耐性を示す *E. coli* 9株、*K. pneumoniae* 5株を対象に 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 CMY 型の class C 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 *E. coli* 9株と *K. pneumoniae* 1株は CMY-9 を、残り *K. pneumoniae* 4株は CMY-9 の variant である CMY-19 を有していた。そこでこれらの遺伝子をそれぞれクローニングし、 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、Mono-S カラムにて精製した酵素を用いた。遺伝学的背景の解析には PFGE を用いた。接合実験は broth method にて行った。

【結果】CMY-9 と CMY-19 では H-10 helix 内の 292 番目のアミノ酸が異なっていた(CMY-9:Ile, CMY-19:Ser)。ABPC、PIPC、CAZ、CFPM の MIC は、CMY-9 産生株と比べ CMY-19 産生株で高く、逆に CTX、CZX、及び各種セファマイシン系抗菌薬の MIC は CMY-19 産生株よりも CMY-9 産生株の方が高値を示した。

またこれらの差異は酵素学的にも裏付けられた。両遺伝子は *orf513* (putative transposase gene) の下流に存在し、その周辺構造は同一であった。PFGE により今回解析した *E. coli* 9株は遺伝学的に同一と判明したが、*K. pneumoniae* 5株についてはそのバンドパターンは大きく異なった。上記 β -ラクタマーゼ遺伝子は伝達能を有する plasmid 上にコードされていると考えられ、その伝達効率は 10^{-6} ~ 10^{-4} であった。

【考察】一般に CFPM は AmpC 型 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 CMY-19 は class C に属するにも関わらず明らかに CFPM の分解活性を示した。最近では *E. coli* や *S. marcescens* の染色体性の AmpC で CFPM 分解能を有する変種が報告されている。上記のようにかつて class A 型の TEM-、SHV-ペニシリナーゼがアミノ酸置換により ESBL と化したように、class C 型の AmpC においてもアミノ酸置換により基質特異性が拡張したものが出現する事が予想されるため、今後、その動向に注目する必要がある。

黄色ブドウ球菌 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)

【目的】昨年開催された本研究会において、演者は、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を遺伝学的に示した。しかし、この両者において、PBP1 は、ベータラクタム剤感受性 PBP として位置づけられている。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 のベータ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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 30°C, 15 分反応させ、PBS で 3 回洗浄後、マイクロビ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 (Bocillin FL, Molecular Probe 社) を反応させ、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。

【結果と考察】破碎して得た膜画分に対してではなく、全菌体にイミペネムを反応させておこなった今回の PBP アッセイでは、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のイミペネムをもちいても残りの約 3% の PBP1 に対する反応は見られなかった。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。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。実際に、通常おこなわれる競合 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蛋白に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。同様な現象は、未標識ペニシリン G をもちいておこなったアッセイでも確認することができた。以上のことより、ベータラクタム剤存在下での MRSA の増殖には、PBP2' と、ベータラクタム剤不反応性の少量の PBP1 の両者が必要であると考えることができた (この両者だけで 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)。今回おこなった PBP アッセイで観察されたイミペネム易反応性、および不反応性 PBP が、各々菌体のどこに存在するのかを明らかにするには、新たな蛍光検出系の開発やベータ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。

日本国内におけるチフス菌・パラチフス A 菌の分離状況

廣瀬健二 渡邊治雄

国立感染症研究所細菌第一部

腸チフス・パラチフスは、日本を除く東アジア、東南アジア、インド亜大陸、中東、東欧、中南米、アフリカなどに蔓延し、現在も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。腸チフス・パラチフスの集団発生は、1990年代になっても発生があり、1993年に首都圏で50名の腸チフス患者、1994年には近畿地方で34名のパラチフス患者、1998年には関東地方で約20名のパラチフス患者がみられている。2000年代に入ってから年間腸チフス約60例、パラチフス30例ほどの発生が見られている。

腸チフス、パラチフスには抗菌薬の投与による治療が行われる。現在ではニューキノロン系抗菌薬が第一選択薬として使われている。ニューキノロン剤(LVFX, SPFX, TFLX)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、腸チフスの治療の第一選択薬であるニューキノロン系抗菌薬のシプロフロキサシン(Ciprofloxacin)に耐性または低感受性を示す株の存在が数多く報告されている。日本にもニューキノロン系抗菌薬に低感受性を持つチフス菌・パラチフス A 菌が、海外からの輸入事例として入ってきている。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薬による治療には反応せず、速やかに解熱しない。現在までにニューキノロン系抗菌薬による治療が奏功しなかった腸チフス・パラチフスの症例も多く報告されている。このようなニューキノロン低感受性菌は1998年より急激に増加している。2002年では、日本で分離されるチフス菌の29%、パラチフス A 菌の65%がニューキノロン低感受性菌であった。また、2002年には、国内ではじめてニューキノロン剤耐性パラチフス A 菌が分離された。今後、腸チフスの治療には直ちにニューキノロン系抗菌薬を投与するのではなく、分離菌株の薬剤感受性試験を行ってから治療を始める姿勢が必要となってきた。ニューキノロン系抗菌薬耐性菌が増加するのは時間の問題であり、引き続き腸チフス・パラチフスの発生の動向を監視する必要があると考えられる。

サルモネラ DT104 の多剤耐性領域を含むトランスポゾン Tn2610 の構造解析

高屋明子¹・友安俊文¹・渡邊正人²・○山本友子¹

¹千葉大学大学院薬学研究院・微生物薬品化学、²山之内製薬・微生物研究所

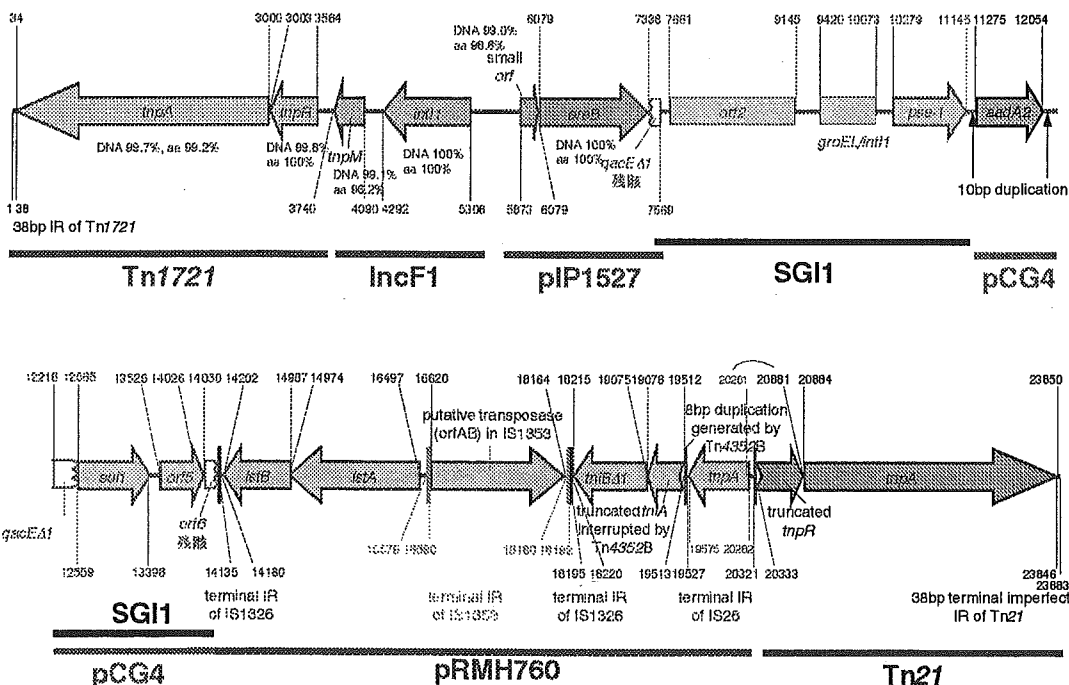
S. enterica serovar Typhimurium (ST) は、serovar Enteritidis (SE) と同様に国内外を問わず食中毒の原因菌として重要な病原体である。欧米では 90 年代に入ってから多剤耐性の ST 特に DT104 が急激に増加して大きな問題となっているが、我が国でも近年、ヒトや家畜においてその増加が報告されている。多剤耐性 DT104 の特徴は、複数の耐性遺伝子が染色体上 43kbp の *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) と名付けられた領域に存在することである。SGI1 の両端に 18 bp の direct repeat が存在することから、この Island がサルモネラゲノムに挿入したと考えられている。Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamide, Tetracycline に対する耐性遺伝子は、SGI1 内の 14kb にわたる領域に 2 個のインテグロン (InC と InD) と共に存在する。世界各地で分離された DT104 の majority は SGI1 を有しているが、さらなる耐性遺伝子の付加や SGI1 の再配列等によって構築されたと考えられる variant も多数分離されていることから、疫学調査に加え、SGI1 の起源と進化、さらに SGI の水平伝搬のメカニズム等に関する分子生物学的研究が必要であると考えられる。

SGI1 の Ampicillin 耐性遺伝子は PSE-1 タイプの β -lactamase をコードする *pse1* である。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 *pse1* を含むトランスポゾン Tn2610 を見出し (Yamamoto et al. 1983)、これが多剤耐性の複合トランスポゾンであることを報告してきた (Yamamoto, 1989)。Tn2610 の耐性遺伝子領域が SGI1 のプロトタイプである可能性を考え、今回は Tn2610 (23883bp) の全塩基配列を決定し、詳細な構造解析を行った。結果は下図に示したが、Tn2610 と SGI1 の多剤耐性領域は共通の祖先を持つと考えられる。構造解析結果の詳細を報告する予定である。

References : Yamamoto T. et al. (1983) Mol. Gen. Genet. 189:282-288.

Yamamoto T. (1989) Antimicrob. Agents Chemother. 33:746-750.

Structure of Tn2610 (23883 bp)



我が国における VRE の分離状況および遺伝子型に関する調査研究

富田 治芳¹、荒川 宜親²、芹川 武大³、長沢光章⁴、
藤本 修平¹、谷本 弘一⁵、野村 隆浩¹、池 康嘉^{1,6}

¹ 群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学、² 国立感染症研究所 細菌第二部、³ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞医学専攻 細胞機能講座生殖医学病態解析学分野、⁴ 防衛医科大学校病院 検査部、⁵ 群馬大学 附属薬剤耐性菌実験施設

VanA 型、VanB 型または VanD 型は VRE が回答のあった 1,778 施設のうち 31 施設 (26 医療施設、5 検査センター) (1.7%) で分離された。VRE 型は、VanA 型が 14 施設 (12 医療施設、2 検査センター)、VanB 型が 15 施設 (12 医療施設、3 検査センター)、VanA および VanB 型が分離されたのは 1 医療施設、VanD 型が 1 医療施設から、それぞれ分離された。VRE が分離された全症例数は 128 例である。VanA 型は 71 例 (55%)、または VanB 型は 56 例 (44%)、VanD 型は 1 例 (1%) から分離された。3 症例の施設のうち、1 症例のみの施設は 16 施設 (12 医療施設、4 検査センター) (53.3%)、2 症例の施設は 6 施設 (4 医療施設、2 検査センター) (20%)、3 症例の施設は 3 医療施設 (10%) であった。これらの 3 例以下の少数分離施設は、分離施設 (31 施設) のうち 25 施設 (80.6%) であった。6 症例以上の多数の分離症例のある施設は 6 施設で、それぞれ症例数は 6、8、9、17、24 および 27 の症例であった。

128 例のうち、便以外の検査材料から分離された症例は 54 症例 (42.2%) であった。その多く (31 例、57.4%) は尿から分離され、次いで 13 例 (24.1%) において痰または咽頭部から分離され、血液および髄液の分離例がそれぞれ 1 例あった。これらの便以外の検査材料からの分離例 54 例のうち、感染症新法により報告されているものは 14 例 (26%) であった。また、128 例のうち便保菌者は 93 例 (73%) であった。VRE が分離された 31 施設のうち、菌株が保存されていた 19 施設 (17 医療施設、2 検査センター) から、合計 81 株の VRE が分与された。菌株が分与された 17 医療施設のうち、8 施設の VRE は複数患者から分離された複数の VRE であった。そのうち 6 施設 (6/8(75%)) で、それぞれの施設の分離株の全部または一部は、染色体 DNA の遺伝子型および各種薬剤耐性値から、同一の株であることが推測された。

VRE の多くは各種の薬剤に耐性の多剤耐性であった。分与された 19 施設の中で、9 施設の 18 人から合計 23 株の VanA 型 VRE が分離されていた。この中で、4 施設、5 人の患者から分離された VanA 型 VRE は、タイ産鶏肉由来 VanA 型 VRE と同じ VanA 型遺伝子構造をしていた。

我が国における CTX-M-型 β -ラクタマーゼの分布調査

柴田尚宏、黒川博史、鈴木里和、和知野純一、山根一和、荒川宜親

(国立感染研 細菌第二部)

欧米の臨床現場では、セフトジジム(CAZ)やセフトキシム (CTX)などの第三世代セファロスポリンに耐性を獲得した肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)や大腸菌(*Escherichia coli*)が増加している。これらの多くは、いわゆる ESBL(Extended-Spectrum β -Lactamase: 基質拡張型 β -ラクタマーゼ)を産生する株と考えられているが、我が国では、この種の耐性株は未だ希である。しかし、国内では、CTX に対し高い分解活性を示すものの CAZ など殆ど分解できない CTX-M-型 β -ラクタマーゼが臨床現場で多く分離される傾向がある。

ESBL と CTX-M-型 β -ラクタマーゼは、クラス A 型 β -ラクタマーゼに属し、ともにクラブラン酸により強く阻害されるが、分解できる β -ラクタム薬のスペクトルが異なる為、臨床的に識別が必要となっている。

米国臨床検査標準化委員会(NCCLS)では、ESBL 産生株の場合「全てのセファロスポリンに耐性」と報告する事が推奨されているため、クラブラン酸を用いた現行の鑑別試験法により CTX-M 型 β -ラクタマーゼ産生株が「ESBL 産生株」と報告された場合、CTX-M 型 β -ラクタマーゼにより殆ど分解されない CAZ などを「無効」と理解される恐れがあり、その点の妥当性については検討すべき余地が多く残されている。

今回、我々は、ESBL と CTX-M-型 β -ラクタマーゼを識別するため、 β -ラクタム薬耐性のパターンや阻害剤に対する挙動などの表現型からそれらを簡便に鑑別するディスク法を検討した。

具体的には、CTX-M-型 β -ラクタマーゼには、既に CTX-M-1 から CTX-M-38 までのバリエーション型が確認されており、これらは 5 つの遺伝子型に分類できるが、それらは、いずれもスルバクタム(SBT)により阻害され難いという特徴に着目することで SBT に阻害される TEM-、SHV-由来 ESBL 産生株と大まかに識別する事が可能である。さらに表現型と遺伝子型を対比させつつ、シーケンス解析により詳細なバリエーション型を確定し、そのデータを蓄積する事により、我が国での分離状況の把握を目指した。詳細は班会議にて報告する。

メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) への非可逆的阻害剤の作用機構

熊本大学大学院医学薬学研究部 ○黒崎博雅、山口佳宏、(故)後藤正文
 国立感染症研究所 細菌第二部 荒川宜親

薬剤耐性機構の1つに薬剤不活化酵素、metallo-β-lactamase (MBL)の産生が挙げられる。MBLはほとんど全てのβ-ラクタム剤を加水分解することが知られており、特にMBLの1つであるIMP-1は、耐性遺伝子が伝達性のプラスミド上に存在するため、菌種を超えた水平的な伝播が可能である。そのため、IMP-1産生菌のさらなる爆発的蔓延が危惧されている。しかし、現在臨床において有効な阻害剤は存在せず、阻害剤の早急な開発が求められている。

IMP-1に対する阻害剤はいくつか報告されているが、未だ臨床応用された阻害剤はない。我々は、IMP-1に存在する求核性側鎖を持つアミノ酸残基と共有結合させることで非可逆的に阻害する阻害機構を考案した(Fig.1)。その構想に基づいて非可逆的阻害剤を合成し、それらのIMP-1に対する阻害、および阻害の非可逆性、MALDI-TOF MS、X線結晶構造解析による阻害機構の検討を行った。その結果、

- 1) 合成した阻害剤のIMP-1に対するIC₅₀は、いずれもnMオーダーであり、強い阻害能を示した。
- 2) 100倍量の阻害剤とIMP-1をインキュベートさせ、遊離の阻害剤をゲルろ過によって除去したIMP-1は活性の回復が見られず、IMP-1を非可逆的に阻害した。
- 3) 10倍量の阻害剤で処理し、活性が非可逆的に阻害されているIMP-1の分子量測定により、IMP-1と阻害剤が1対1で反応しているスペクトルが得られた。
- 4) 阻害剤で処理したIMP-1のX線結晶構造解析により、阻害剤のチオール基が亜鉛(II)に配位し、224位のLysの側鎖とアミド結合で共有結合をしていた。

以上の結果より、考案した非可逆的阻害機構に基づいて合成した阻害剤は、機構通りの共有結合による非可逆的阻害をすることが分かった。

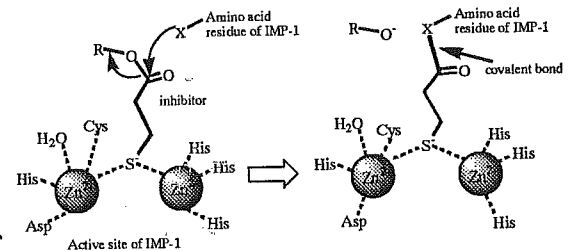


Fig.1. Irreversible inhibition mechanism

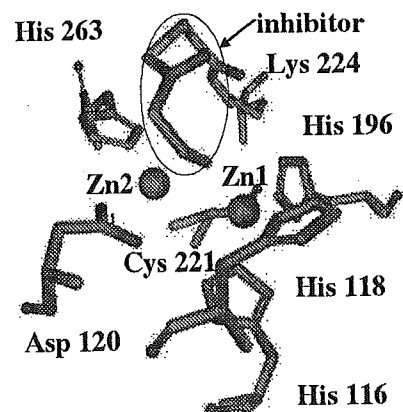


Fig.2. The crystal structure of IMP-1 modified by inhibitor

型の異なる複数のβ-ラクタマーゼを同時に産生する株の識別法

荒川宜親、和知野純一、八木哲也、柴田尚宏、山根一和、鈴木里和

(国立感染研 細菌第二部)

【目的】近年、オキシミノセファロスポリンやセファマイシン、カルバペネムを分解する様々な種類のβ-ラクタマーゼが出現し、グラム陰性桿菌においてそれらを産生する株が国内外で増加、蔓延しつつある。たとえば、クラス A には、TEM-、SHV-由来 ESBL、CTX-M-型β-ラクタマーゼ、GES-型β-ラクタマーゼなどが含まれる。クラス B には、カルバペネムを分解するメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) が含まれる。クラス C には、染色体性に産生される AmpC 型、主としてプラスミド依存性に産生される CMY-型、FOX-型、ACC-型、DHA-型セファロスポリナーゼなどが含まれる。さらに、クラス D には OXA-型β-ラクタマーゼが含まれる。菌が産生するβ-ラクタマーゼの型は、化学療法の際に抗菌薬を選択する際に重要な参考となるため、識別する事が望まれているが、一部の株では、これらのうちの2種類以上の型の酵素を産生しているため、識別が困難な場合も多い。そこで、それらを簡便に識別する方法を考案した。

【対象と方法】クラス A、B、C のβ-ラクタマーゼに各々特異的な阻害活性を示すβ-ラクタマーゼ阻害剤を用い、それらを2種類以上含んだ反応系を作成した。そして、PCR 解析などによりあらかじめクラス A、B、C のβ-ラクタマーゼを単独、あるいは複数産生する事が確認されている株を用いて検証を行った。

【結果】本試験法により、クラス A、B、C のβ-ラクタマーゼを単独、あるいは複数産生する株を簡便かつ迅速に識別する事が可能であった。

【考察】現在、細菌検査室の日常検査業務の中で、クラブラン酸による阻害で識別できる ESBL 産生株や CTX-M 型β-ラクタマーゼ産生株、さらに、メルカプト酢酸ナトリウム、ジピコリン酸、EDTA により簡便に識別できるメタロ-β-ラクタマーゼ産生株については、多数の分離実績が上がっており、報告件数も増加している。しかし、クラス C 型β-ラクタマーゼ産生株については、これまで識別方法が確立されておらず、十分にその存在が確認できないままとなっていた。AmpC の過剰産生株、AmpC のヴァリアント産生株、さらに CMY-型β-ラクタマーゼ産生株の中にはセファマイシンに耐性を示すものが多く、セファマイシンを分解できない ESBL や CTX-M-型β-ラクタマーゼより、それらは、臨床的に危険な酵素と考えられるが、本試験法の開発と確立により、複数の型のβ-ラクタマーゼを同時に産生し多剤耐性を示す株についても、簡便に酵素型を識別する事が可能となった為、今後、国内外での AmpC 型β-ラクタマーゼの単独または複数産生株の分離・検出報告の件数の増加とともに、適切な化学療法、感染対策の実施、推進が期待される。