

Fig. 4 より 1 μM の DansylCnSH ($n = 2-6$)、DansylSH に IMP-1 を段階的に添加していくと、IMP-1 の濃度の増加と共に蛍光強度は増大し、極大波長は約 535 nm からそれぞれ DansylC2SH のとき 525 nm、DansylC3SH のとき 523 nm、DansylC4SH のとき 519 nm、DansylC5SH と DansylC6SH のとき 527 nm、DansylSH のとき 516 nm へとシフトし、いずれも低波長側へシフトした (Table 3)。特に、DansylSH は蛍光強度が約 16 まで増大した。

そこで 535 nm における蛍光強度を IMP-1 の濃度に対してプロットした (Fig. 5)。すると、いずれの蛍光剤においても IMP-1 濃度が 1 μM までは濃度の増加と共に蛍光強度は急激に増大し、それ以降は次第に飽和する現象が観測された。これは、 $\text{DansylCnSH} + \text{IMP-1} \rightleftharpoons \text{DansylCnSH} \cdot \text{IMP-1}$ として解析することができ、これより求められた (6) 式の回帰曲線から解離定数 K_d を求めた (Table 3)。各々の解離定数 K_d は 356 nM (DansylC2SH)、975 nM (DansylC3SH)、67 nM (DansylC4SH)、154 nM (DansylC5SH)、105 nM (DansylC6SH)、111 nM (DansylSH) となった。これより DansylC4SH が最も解離定数 K_d の値が小さく IMP-1 に結合しやすいことが分かった。

Table 3. Dissociation constants and λ_{max} of Dansyl derivatives with IMP-1.

Dansyl derivatives	K_d / nM	λ_{max} / nm
DansylC2SH	356 \pm 66	525
DansylC3SH	975 \pm 110	523
DansylC4SH	67 \pm 14	519
DansylC5SH	154 \pm 41	527
DansylC6SH	105 \pm 42	527
DansylSH	111 \pm 32	516

第2節 DansylCnSH ($n = 2-6$) による IMP-1 阻害の検討

緒論でも述べたように、低分子量チオール化合物が IMP-1 の活性中心の亜鉛(II)に配位することで IMP-1 を阻害することが分かっており、例えば 3-メルカプトプロピオン酸 は阻害定数 $K_i = 1.2 \mu\text{M}$ 、メルカプト酢酸は $K_i = 0.23 \mu\text{M}$ で阻害する。そこでチオール基をもつ本蛍光剤 DansylCnSH ($n = 2-6$) についても IMP-1 の活性を阻害すると期待される。そこで、それぞれの DansylCnSH ($n = 2-$

6) の濃度に対して見かけの分子活性 k_2 / min^{-1} をプロットし、IMP-1 に対する IC_{50} (酵素活性を 50% 阻害する濃度) と (10) 式の拮抗阻害の回帰曲線より阻害定数 K_i 値を求めた。DansylC4SH 濃度に対しての見かけの分子活性 k_2 / min^{-1} のプロットを Fig. 6 に、それぞれの IC_{50} と阻害定数 K_i を Table 4 に示す。

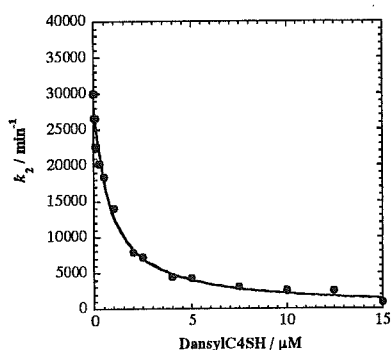


Fig. 6. Plot of apparent activity k_2 against the concentration of DansylC4SH. The curve was obtained by nonlinear least-squares fitting of competitive inhibition mode. Activity was measured by hydrolysis of nitrocefin at 30 °C, in 50 mM Tris-HCl Buffered solution (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl.

Table 4. IC_{50} and K_i of DansylCnSH (n = 2–6).

DansylCnSH	$\text{IC}_{50} / \mu\text{M}$	K_i / nM
DansylC2SH	5.2	1100 ± 60
DansylC3SH	7.2	1300 ± 100
DansylC4SH	0.7	140 ± 10
DansylC5SH	1.6	280 ± 10
DansylC6SH	1.0	160 ± 10

Table 4 より DansylCnSH (n = 2–6) は IMP-1 の活性を阻害することが分かった。各々の IC_{50} は 5.2 μM (DansylC2SH)、7.2 μM (DansylC3SH)、0.7 μM (DansylC4SH)、1.6 μM (DansylC5SH)、1.0 μM (DansylC6SH) となった。また拮抗阻害として解析することができその回帰曲線から各々の阻害定数 K_i は 1100 nM (DansylC2SH)、1300 nM (DansylC3SH)、140 nM (DansylC4SH)、280 nM (DansylC5SH)、160 nM (DansylC6SH) となり、蛍光スペクトルから求めた解離定数 K_a 値 (Table 3) とほぼ一致する結果となった。以前報告された 3-メルカプトプロピオン酸 は IMP-1 に対して阻害定数 $K_i = 1.2 \mu\text{M}$ を示す。これに比べると DansylCnSH (n = 2–6) はより有効な阻害剤として働くことが分かった。その中でも、DansylC4SH は $K_i = 140 \text{ nM}$ で IMP-1 の活性を最も強く阻害することが分かった。以上の結果より DansylCnSH (n = 2–6) は IMP-1 の活性中心に結合すると考えられる。

第3節 IMP-1 と DansylC4SH との複合体の X 線結晶構造解析

IMP-1 と DansylC4SH との複合体は *P. aeruginosa* 由来の IMP-1 (PDF file, 1DD6)²³⁾ を search model として用い分子置換法によって決定され、分解能 2.4 Å で結晶格子に 2 個の独立した構造が存在していた。それぞれ 2 個の亜鉛(II)と 1 個の DansylC4SH を含んでいた。モデル構造の妥当性を表す R は 0.208 で、 R_{free} は 0.247 であった。理想の結合角、結合距離からの root-mean-square deviation (rmsd) はそれぞれ 1.6°、0.010 Å であった。Fig.7 にその全体の構造を、Fig. 8 に活性中心部位の構造を示した。

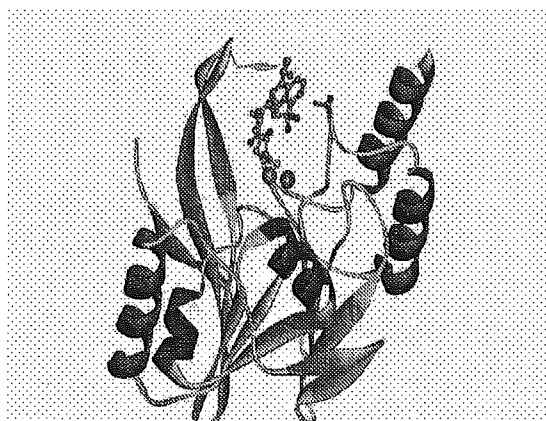


Fig. 7. Sturcture of the complex of IMP-1 with DansylC4SH.

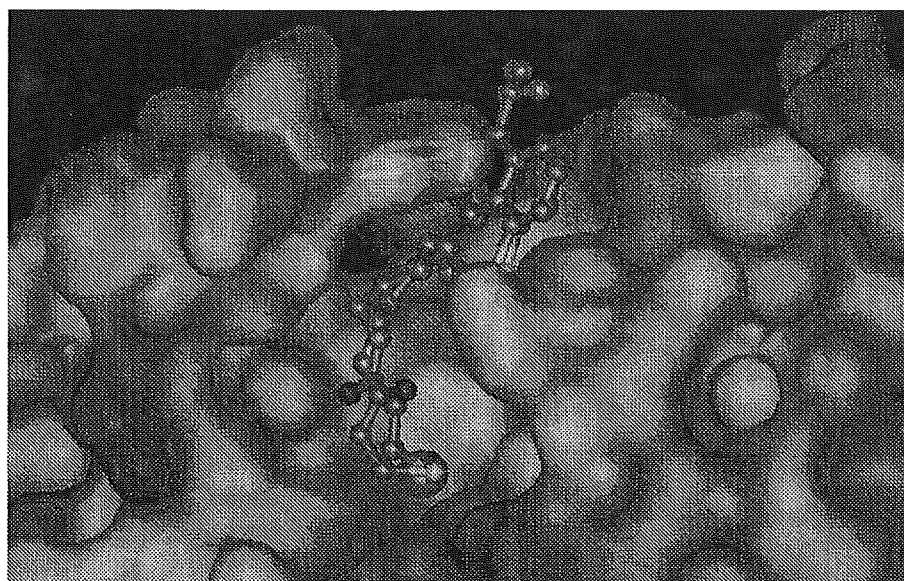


Fig. 8. Molecular surface representation model of the complex of IMP-1 with DansylC4SH.

DansylC4SH のチオール基は IMP-1 の活性中心に存在する 2 個の亜鉛(II)に架橋した形で配位しており、それぞれの距離は 2.11 Å (DansylC4SH-Zn1)、2.77 Å (DansylC4SH-Zn2) であった。メタロ-β-ラクタマーゼの活性中心構造の特徴として、水又はヒドロキシアニオンが架橋配位子として 2 個の亜鉛(II)に架橋していることが挙げられる。しかし、この IMP-1 と DansylC4SH の複合体では確認されず、DansylC4SH のチオール基と置き換わったと考えられる。IMP-1 には 28 位のトリプトファンを含むアンチパラレルβシート上の 22-31 位のアミノ酸残基から構成されるフラップがありフレキシブルで基質や阻害剤が結合する際に重要と考えられている。DansylC4SH が IMP-1 に結合すると、トリプトファンのインドール環は活性中心の方へ大きく向きが変わり、DansylC4SH のダンシル基と edge-to-face で相互作用しているのが分かる。DansylC4SH のダンシル基とチオール基の間のスペーサー部は IMP-1 のアミノ酸残基のいずれとも相互作用しておらず、2 つの構造のいずれかをとっているオルタネートの状態になっていることが分かった。

本研究で用いた DansylC_nSH (n = 2-6) の中でも DansylC4SH の構造は、チオール基が亜鉛(II)に配位しダンシル基が 28 位のトリプトファンと相互作用するのに最適な長さであり、結果として IMP-1 による DansylC4SH の蛍光強度の変化が DansylC_nSH (n = 2, 3, 5, 6) と比べ大きくなったのだろう。また蛍光スペクトルから得られた解離定数 K_a や基質加水分解活性より求めた阻害定数 K_i にも反映され、DansylC_nSH (n = 2-6) の中でも最も小さい値をとったと考えられる。

以上のことより、メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的かつ高感度な蛍光剤の条件として、(1) 活性中心に存在する亜鉛(II)に配位することのできるチオール基が存在すること、(2) フラップ上部に存在する 28 位のトリプトファンと相互作用できる蛍光発色団があること、(3) チオール基と蛍光発色団との間に適切な長さがあることの 3 点が挙げられる。

第 4 章 総括

メタロ-β-ラクタマーゼはカルバペネム薬を含む幅広いβ-ラクタム剤を加水分解し、臨床上用いることのできる阻害剤に感受性がなく、これを産生する病原菌の蔓延が危惧されている。そのため感染菌のメタロ-β-ラクタマーゼの産生の有無を初期段階で確認することは化学療法において非常に重要である。そこでメタロ-β-ラクタマーゼ群に特異的な蛍光剤を目標として、蛍光発色団としてダンシル基をもち末端にチオール基を有する新規蛍光剤 DansylC_nSH (n = 2-6) を合成した。まず、DansylC_nSH

($n = 2-6$) を含むダンシル誘導体とメタロ- β -ラクタマーゼ (IMP-1) との結合相互作用を蛍光スペクトルにより検討を行い、さらに DansylC4SH については IMP-1 との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

DansylC n SH ($n = 2-6$)、DansylSH は 340 nm で励起すると 535 nm で発光した。そこへ IMP-1 を加えると蛍光強度は増大し、極大波長は 520 nm 付近にシフトした。これより、メタロ- β -ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的な蛍光剤には、DansylC n SH ($n = 2-6$) のようにダンシル基とチオール基の間にある程度の長さが必要であることが分かった。DansylC n SH ($n = 2-6$) と IMP-1 は 1 対 1 で結合するとして解析でき、その解離定数 K_d は 70 から 980 nM となり、基質加水分解活性より求めた阻害定数 K_i とほぼ一致した。その中でも、DansylC4SH は最も IMP-1 と強く結合する。

蛍光スペクトルにより、DansylC4SH が最も IMP-1 と結合しやすいことが分かったので、DansylC4SH と IMP-1 との複合体の X 線結晶構造解析を行った。すると DansylC4SH のチオール基は活性中心の 2 個の亜鉛(II)に架橋した形で配位しており、ダンシル基は 28 位のトリプトファンのインドール基と edge-to-face で相互作用していることが分かった。ダンシル基とチオール基の間のスペーサー部は IMP-1 のどのアミノ酸残基とも相互作用をしておらず alternate の状態となっていた。

以上のことより、DansylC n SH ($n = 2-6$) はメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌を簡便かつ高感度な方法で判別することが期待される。また、IMP-1 と DansylC4SH との複合体の X 線の結晶構造解析を深めることにより、メタロ- β -ラクタマーゼ (IMP-1) に対しさらに有効な蛍光剤及び阻害剤の開発に結びつけることができるだろう。

引用文献

- 1) Knowles J. R., *Acc. Chem. Res.*, **18**, 97-104 (1985).
- 2) Wang Z., Fast W., Valentine A. M., Benkovic S. J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 614-622 (1999).
- 3) Page M. I., Laws A. P., *Chem. Commun.*, 1609-1617 (1998).
- 4) Page M. I., *Curr. Pharm. Des.*, **5**, 895-913 (1999).
- 5) Cricco J. A., Vila A. J., *Curr. Pharm. Des.*, **5**, 915-927 (1999).
- 6) Ambler R. P., *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, **289**, 321-331 (1980).
- 7) Sabath L. D., Abraham E. P., *Biochem. J.*, **98**, 11c-13c (1966).
- 8) Kuwabara S., Abraham E. P., *Biochem. J.*, **103**, 27c-30c (1967).
- 9) Davies R. B., Abraham E. P., *Biochem. J.*, **143**, 115-127 (1974).
- 10) Cuchural G. J., Jr., Malamy M. H., Tally F. P., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**, 645-648 (1986).
- 11) Rasmussen B. A., Gluzman Y., Tally F. P., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1590-1592 (1990).
- 12) Bando K., Muto Y., Watanabe K., Katoh N., Ueno K., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 371-372 (1991).
- 13) Massidda O., Rossolini G. M., Satta G., *J. Bacteriol.*, **173**, 4611-4617 (1991).
- 14) Walsh T. R., Hall L., Assinder S. J., Nichols W. W., Cartwright S. J., MacGowan A. P., Bennett P. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1218**, 199-201 (1994).
- 15) Crowder M. W., Walsh T. R., Banovic L., Pettit M., Spencer J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 921-926 (1998).
- 16) Osano E., Arakawa Y., Wacharotayankun R., Ohta M., Horii T., Ito H., Yoshimura F., Kato N., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 71-78 (1994).
- 17) Ito H., Arakawa Y., Ohsuka S., Wacharotayankun R., Kato N., Ohta M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 824-829 (1995).
- 18) Payne R. J., Du W., Bateson J. H., *Exp. Opin. Invert. Drugs*, **9(2)**, 247-261 (2000).

- 19) Bush K., Jocoby G. A., Medeiros A. A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1211-1233 (1995).
- 20) Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., Ito H., Wacharotayankun R., Ohsuka S., Kato N., Ohta M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1612-1615 (1995).
- 21) Cornaglia G., Riccio M. L., Mazzariol A., Lauretti L., Fontana R., Rossolini G. M., *Lancet*, 353, 899-900 (1999).
- 22) Senda K., Arakawa Y., Ichiyama S., Nakashima K., Ito H., Ohsuka S., Shimokata K., Kato N., Ohta M., *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2909-2913 (1996).
- 23) Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K., Kurokawa H., Yagi T., Fujiwara H., Goto M., *J. Clin. Microbiol.*, 38, 40-43(2000).
- 24) National committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
- 25) Goto M., Takahashi T., Yamashita F., Koreeda A., Mori H., Ohta M., Arakawa Y., *Biol. Pharm. Bull.*, 20, 1136-1140 (1997).
- 26) Otwinowski Z., Minor W., "*Methods Enzymol*", 276, 307-326 (1996).
- 27) Concha N. O., Janson C. A., Rowling P., Pearson S., Cheever C. A., Clarke B. P., Lewis C., Galleni M., Frère J-M., Payne D. J., Bateson J. H., Abdel-Meguid S. S., *Biochemistry*, 39, 4288-4298 (2000).
- 28) Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". *Acta Crystllogrt.* D50, 760-763 (1994).
- 29) Brunger A. T., Adams P. D., Clore M., DeLano W. L., Gros P., Gross-Kunstelev R. W., Jian J-S., Kruszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T., Warren G. L., *Acta Crystallogr.*, D54, 905-921 (1998).
- 30) Jones T.A., Zou J. Y., Cowan S. W., Kjeldgaard M., *Acta Crystallogr.*, A47, 110-119 (1991).

臨床分離緑膿菌の多剤耐性化に機能する排出システムの性状解析

分担研究者: 後藤 直正; 研究協力者: 村田 健、西野 武志
京都薬科大学・微生物学教室

緑膿菌の多剤排出システムが関与する抗菌薬耐性機構を臨床分離株および実験室株を用いて調べた結果、キノロン薬耐性には MexAB-OprM と MexXY-OprM が、アミノ配糖体耐性には MexXY-OprM が重要な役割を担っていることが分かった。さらに感染症患者より得られた検体から抗菌薬耐性などの情報を短期間に得られるシステム開発の一端として、臨床分離緑膿菌株を対象に抗菌薬排出システムおよび外膜透過孔に起因する抗菌薬耐性機構の発現を定量的 RT-PCR によって mRNA レベルで観察し、その結果と各種抗菌薬感受性とを比較することによって分離された緑膿菌株の抗菌薬感受性を mRNA レベルで推定可能かどうかを調べたところ、高発現していない耐性機構を推定し、それに応じた治療薬を選択できる可能性を示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

異物排出システムは細菌に限らず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の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⁺) 勾配によるプロトン駆動力型である。

プロトン駆動力を利用して機能する排出

タンパク質は、少なくとも 4 つのファミリーに分類されるが、その中でも外膜を有するグラム陰性菌に広く分布する RND 型多剤排出システムは、RND タンパク質が単独で機能するのではなく、図 1 で示すように外膜排出タンパク質（outer membrane fusion protein; OEP）とペリプラズム排出タンパク質（membrane fusion protein; MFP）のコンポーネントとの共同作業によって効率よく細胞外へ異物（基質）を輸送すると考えられている。

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

表1 緑膿菌の主なMexシステムと排出される抗菌薬

Efflux system	Substrates
MexA-MexB-OprM	Quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, chloramphenicol, novobiocin, b-lactams except imipenem
MexC-MexD-OprJ	Quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, chloramphenicol, novobiocin, penicillins except carbenicillin and sulbenicillin, cepheims except ceftazidime, flomoxef, meropenem
MexX-MexY-OprM	Quinolones, macrolides, tetracyclines, lincomycin, chloramphenicol, aminoglycosides, penicillins except carbenicillin and sulbenicillin, cepheims except ceftulodin, and ceftazidime, meropenem

Masuda Nほか: *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3322-3327, 2000より一部改変

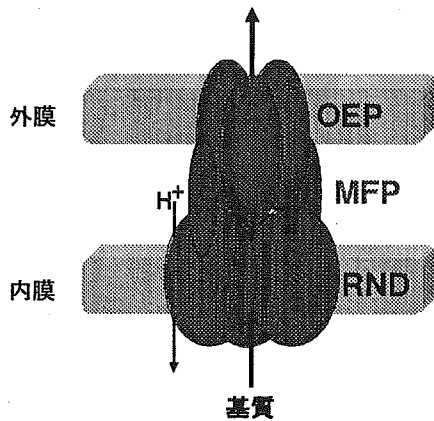


図1 RND型多剤排出システムの構造モデル
本システムは外膜、内膜またはペリプラズムに局在する3つのコンポーネントにより機能する。OEP (outer membrane protein), MFP (membrane fusion protein), RND (Transporter protein)

とつが RND 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表1に示すような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 (図2) ことを示唆し、未知のシステムの解析が現在行われている。以上のように、Mex システムの臨床における抗菌薬耐性への関与が示唆されるが、実際の報告は実験室株を用いた例が多く、

臨床分離株での Mex システムの機能を報告した例は少ない。そこで本研究では、Mex システムの臨床的意義を調べるため、臨床分離緑膿菌のキノロンおよびアミノ配糖体耐性機構の解析を目的に、多剤排出システムおよびキノロン薬の標的である DNA gyrase A subunit (GyrA) および DNA topoisomerase IV A subunit (ParC) の変

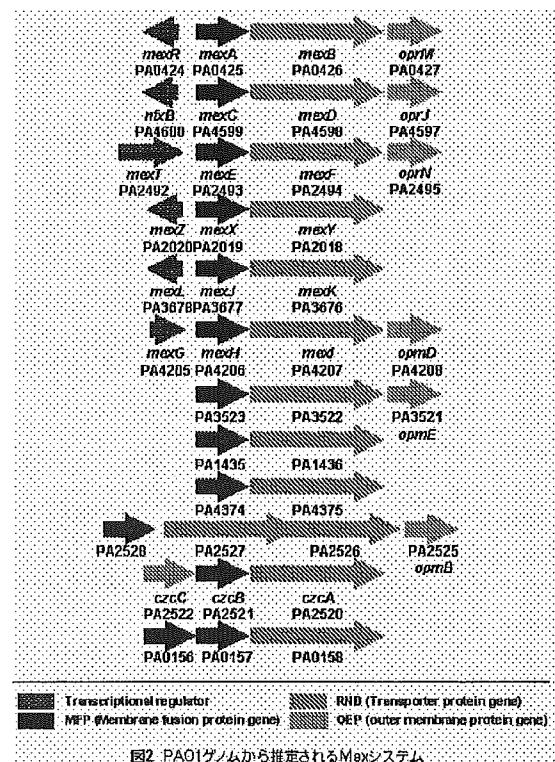


図2 PAO1ゲノムから推定されるMexシステム

異の検出を行った。一方、感染症患者より得られた検体から抗菌薬耐性などの情報を短期間に得る方法が求められているが、そのシステム開発の一端として、臨床分離緑膿菌株を対象に抗菌薬排出システムおよび外膜透過孔に起因する抗菌薬耐性機構の発現を定量的 RT-PCR によって mRNA レベルで観察し、その結果と各種抗菌薬感受性とを比較することによって分離された緑膿菌株の抗菌薬感受性を mRNA レベルで推定可能かどうかを調べた。

B. 研究材料と方法

1. 多剤耐性緑膿菌におけるキノロンおよびアミノ配糖体耐性機構の解析

2001年に分離された多剤耐性緑膿菌5株を実験に用いた。排出システムの発現は、すでに報告した抗 OprM 抗体、抗 MexX 抗体および抗 MexB 抗体を用いたイムノプロット法により解析した。また、排出システムの遺伝子のノックアウトはすでに報告した相同的組み換え法により行った。GyrA および ParC の変異は、それぞれのキノロン耐性決定領域 (QRDR) の塩基配列を調べ、PAO1 株のそれと比較することにより同定した。

2. 実験室株 PAO1 と人工的に構築した抗菌薬排出システムおよび外膜透過孔の発現株および欠損株を用いた。更に、2002年6月から2003年6月に分離された緑膿菌株の内9株を選択した。1晩培養後の各菌体から Total RNA を精製し、抗菌薬排出タンパク質をコードする *mexB*, *mexY* およびカルバペネム系薬の透過孔をコードする *oprD* の発現を定量的 RT-PCR および特異抗体を用いたイムノプロットで観察し、抗

菌薬感受性測定の結果と比較した。

C. 結果および考察

1. 臨床分離緑膿菌における多剤耐性機構の解析

1-1 臨床分離多剤耐性緑膿菌株の感受性測定

臨床分離多剤耐性緑膿菌 5 株 (1519, 1524, 1527, 1528 および 1529) のキノロンおよびアミノ配糖体に対する感受性測定の結果、すべての株の NFLX, CPFX および LVFX に対する MIC が少なくとも 1 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示し、そのうち 4 株は 128 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した。一方、AMK および TOB 対しては、すべての株が 1 $\mu\text{g/ml}$ 以上を示した。これらのことは、本研究において使用した臨床分離多剤耐性株がキノロンおよびアミノ配糖体に高度耐性であることを示す。

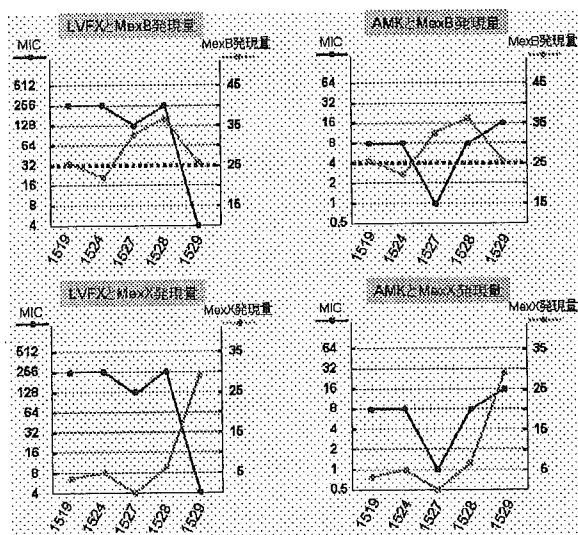


図3 MexBおよびMexYの発現量とLVFXおよびAMKに対するMICとの比較

1-2 Mex システムの発現量と抗菌薬感受性

本研究で使用した菌体の膜成分を調製した後、既報の特異抗体を用いたイムノプロットによって発現量を解析した。各菌株の MexB および MexY の発現量とキノロンお

およびアミノ配糖体に対する感受性を比較した結果を図3に示す。アミノ配糖体耐性に関与することが知られている MexXY-OprM を構成する MexX の発現量と AMK に対する耐性度は正の相関を示した。一方、MexB の発現量との比較は相関性がなかった。これらのことは、既報の実験室株を用いた研究において MexXY-OprM がアミノ配糖体耐性に寄与すること、MexAB-OprM は寄与しないことと一致する。LVFX については、MexB の発現量と相関が得られなかった。本研究で用いた株は LVFX に対する耐性度が高過ぎたため (MexAB-OprM が高進した実験室株の各種キノロンに対する MIC は少なくとも 4 µg/ml 以下である)、排出システム以外の耐性機構が重なっていることが相関性が得られなかった原因である可能性も否定できない。

1-3 臨床分離多剤耐性緑膿菌株の QRDR の解析

本研究で用いた臨床分離株 5 株すべてについて *gyrA* および *parC* の QRDR の塩基配列解析から予想されるアミノ酸配列を野生株 PAO1 と比較したところ、4 株が GyrA および ParC に 1 箇所ずつ、それぞれの株で共通した位置にアミノ酸の相違が観察された。また、キノロン耐性度が他の株に比べて低い 1 株は ParC には見られなかったが、GyrA に 1 箇所のみ他の株と同様の位置にアミノ酸の相違が存在していた。既報の実験室株を用いた研究において、これらの位置のアミノ酸変異がすべてキノロン耐性に関与することが示されている。以上のことから、今回用いたすべての臨床分離株

は作用部位の変化によるキノロン耐性機構を持つことが示唆された。

1-4 排出システム欠損株の解析

MexAB-OprM と MexXY-OprM はそれぞれ共通の外膜コンポーネント OprM を機能発現に必要とすることが知られる。そこで、臨床分離株 (1529) から OprM を欠損した株を作製し、2 つの Mex システムのキノロンおよびアミノ配糖体耐性への影響を調べた。その結果、OprM の欠損株は LVFX および AMK の MIC をそれぞれ 16 倍および 8 倍減少させた。このことは、既報の実験室株と同様に、臨床分離多剤耐性緑膿菌株でも 2 つの Mex システムがキノロンおよびアミノ配糖体耐性に関与していることを示す。

以上より、臨床分離緑膿菌の抗菌薬耐性において、作用標的の変化による耐性化と同様に、Mex システムによる抗菌薬耐性機構の存在意義を示すことができた。

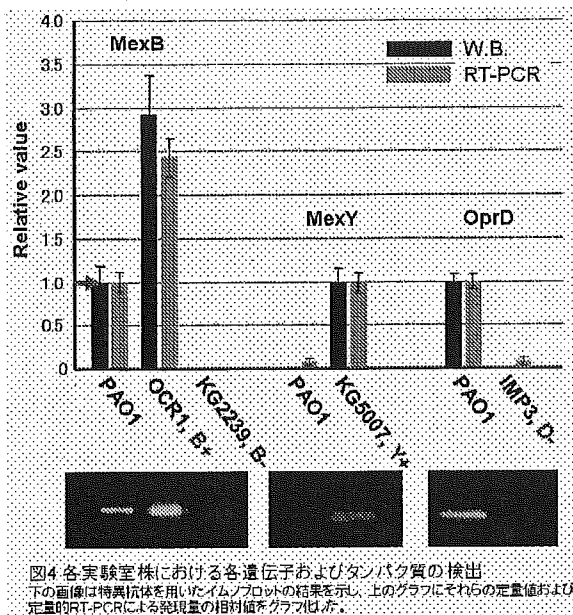
2 定量的 RT-PCR 法を利用した緑膿菌多剤排出システムの発現検出

2-1 実験室株での排出システム発現量の比較

実験室株 PAO1 と MexAB-OprM, MexXY, OprD それぞれの発現株および欠損株の *mexB*, *mexY* および *oprD* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR およびイムノブロットによる発現量を比較した結果、それぞれに良好な相関性が観察された (図4)。

2-2 各臨床分離株における排出システム発現量の比較

臨床分離株については、*mexB* および *mexY* の発現量は定量的 RT-PCR の結果と



イムノブロットの結果とでほぼ相関していたが、mRNA 検出量が蛋白質検出量よりも若干高い株が数株存在していた。このことから、翻訳または翻訳後に何らかの制御が存在することが示唆された。oprD については、mRNA 検出量と蛋白質検出量間での相関性が乏しい結果となったが、現在、定量的 RT-PCR での検出プライマー配列が適切かどうかを調べるために今回用いた臨床分離株の oprD の塩基配列の解析を行っている。

2-3 各臨床分離株の排出システム発現量と抗菌薬感受性との比較

mexB および mexY から産生される mRNA の検出量と抗菌薬感受性を比較した結果、発現検出量が高いにもかかわらず、その耐性機構に起因する抗菌薬耐性が観察されない株が存在したが、逆に検出量が野生株 PAO1 と同等またはそれより低下している株では、耐性化を示す株は存在しなかった。このことは、臨床分離株の mRNA から抗菌薬耐性に影響を与える遺伝子の発現

量を測定することによって、高進していない耐性機構を推定し、それに応じた治療薬を選択できる可能性を示唆している。

結論

過去に研究されてきた実験室株における Mex システムによる抗菌薬耐性機構は、本研究結果から臨床分離多剤耐性緑膿菌にも存在することが示された。よって、臨床における適切な治療薬選択にも Mex システムの発現を考慮に入れる必要があると考えられ、その早期検出法の開発が期待される。

研究発表（論文のみに限った）

1. Hacquet, D., Vogne, C., Garch, F.E., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskata, O., and Plesiat, P. 2003. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1371-1375.
2. Gotoh, N., Murata, T., Kimura, T., Ozaki, T., Kondo, A., and Nishino, T. 2003. Intrinsic Resistance of *Escherichia coli* to mureidomycin A and C due to expression of the multidrug efflux system AcrAB-TolC: comparison with the efflux systems of mureidomycin-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.* 9:101-103.
3. Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T., and Tuchiya, T. 2003. Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:991-994.

平成15年度分担研究報告書

アミノグリコシド耐性菌のレファレンス因子の特定と迅速簡便検出法に関する研究

分担研究者 堀田国元

国立感染症研究所生物活性物質部

研究協力者 石野敬子、石川 淳、土崎尚史

国立感染症研究所生物活性物質部

臨床分離されたMRSAと緑膿菌を対象にアミノグリコシド耐性に関する因子の解析を行い、以下のような成果を得た。

1. MRSAにおけるアミノグリコシド (AG) 耐性

これまでの研究で確立した遺伝子の迅速簡便検出法 (Multiplex Colony Direct PCR) を用いて、平成15年に分離されたABK耐性菌100株のAG耐性、AG修飾酵素 (AME) 遺伝子プロフィール、およびコアグララーゼ遺伝子型 (*coa* PCR- *AluI* RFLP) を調べ、以下の結果を得た。

- 1) コアグララーゼ遺伝子型に関して、L21型が支配的で、90年代からの傾向に顕著な変動は認められなかった。また、型別ごとのAG修飾遺伝子プロフィールにも変化は認められなかった。
- 2) AG耐性とAME遺伝子プロフィールを調べた結果、ABKとGM両方に感受性で二機能酵素遺伝子もない菌株がかなりの頻度で含まれていた。このことから、臨床現場におけるAG耐性の判定にかなりの問題を抱えているケースが依然としてあることがわかり、AG耐性の判定精度の向上にはPCRによる遺伝子チェックと適正濃度のAGを用いての耐性試験が不可欠と判断された。
- 3) 従来調べた菌株も含めてコアグララーゼの生化学型と遺伝子型の整合性を調べたところ、生化学型がII型のものには、異なる遺伝子型が含まれており、遺伝子型に相関するAG耐性遺伝子プロフィールの存在することが明らかになった。

2. 緑膿菌におけるアミノグリコシド (AG) 耐性

AG多剤耐性緑膿菌を対象に、AG耐性と耐性遺伝子の特定と迅速簡便な遺伝子モニタリングの方法の確立に向けて研究を行った。その結果、以下のことが明らかになった。

- 1) MRSAには認められないAG多剤耐性プロフィールを示す。
- 2) 押並べて特定のAGリン酸化酵素遺伝子 *aph(3)* を保持している。
- 3) 一部の菌株では特定のAGアセチル化酵素遺伝子 *aac(6')* を保持する。
- 4) AG耐性プロフィールをこれらの遺伝子の発現だけで説明することはできなかった。

3. 行政施策への貢献の可能性

臨床現場におけるMRSAのABK耐性の判定精度をあげるために、上記の迅速簡便法によるAMEの遺伝子のチェックが不可欠である。また、コアグララーゼ型も遺伝子型を押さえることで、AG耐性の変化を予測することが可能になると思われる。

A. 目的

これまでの研究において、MRSAにおけるアミノグリコシド (AG) 耐性の最大リスクファクターは、アセチル化とリン酸化の二つの機能を持つ二機能酵素の遺伝子であることが明らかとなった。この遺伝子の存否はゲンタマイシン (GM) 耐性と因果関係があること、抗MRSA剤のアルベカシン (ABK) にとっても唯一の耐性因子であるが、この遺伝子の保持によってABK耐性化する菌株は数%に留まっていること、コアグララーゼ遺伝子型 (*coa AluI* RFLP) とAG修飾遺伝子プロファイルの間に密接な相関があり、90年代から一つのコアグララーゼ遺伝子型が支配的になっていることなどを見出した。

このような状況の変動の有無を見るため、平成15年に分離されたABK耐性菌100株のAG耐性、AG修飾酵素遺伝子プロファイルおよびコアグララーゼ遺伝子型について調べることにした。

また、すでに解析した菌株も含めてコアグララーゼの生化学型と遺伝子型との相関性について調べた。

一方、緑膿菌のAG耐性に関しても、AG多剤耐性菌株を対象に、AG耐性とそれらに関与する遺伝子の特定と迅速簡便な遺伝子モニタリングの方法の確立に向けて研究を行うことにした。

B. 研究方法

1. AG耐性

AG耐性は、Kanamycin系4種 (KM, DKB, AMK, ABK) とGentamicin系4種 (GM, SIS0, NTL, ISP) について希釈寒天平板法により調べた。MIC 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を耐性とした。

2. AME遺伝子のMultiplex Colony Direct PCR

MRSAに関しては、*mecA*とともに*aad(4',4'')*、*aad(9)*、*aph(3')-III* および *aac(6')/aph(2'')*の3種のAME遺伝子を標的としてMultiplex CD-PCR増幅を行った(表1)。AGの構造とAMEの修飾部位を図1に示す。

緑膿菌に関しては、*aph(3')-IIb*、*aac(6')-Ia* および *aac(6')-Ib* の3種の遺伝子を標的にCD-PCRを行った(表1)。

PCR反応液組成(表2)は、DNAポリメラーゼとしてKOD-plus-を用い、*aac(6')/aph(2'')*用プライマー濃度を0.5 μM (その他は0.2 μM) としたこと以外はメーカーのプロトコルに従った。この反応液20 μl に、滅菌爪楊枝の先端をコロニー表面に触れることによって目に見えない極少量の細胞を添加し、95°C, 3分 → (95°C, 30秒 → 50°C, 30秒 → 68°C, 1分)

×30回 → 68°C, 3分 → 室温という条件でPCRを行った。

3. コアグララーゼ遺伝子多型の*AluI*-RFLPによる解析

コアグララーゼ遺伝子 (*coa*) の3'末端付近の繰り返し領域を標的としてCD-PCR増幅後、反応液をそのまま*AluI*処理し、その切断パターンをアガロース電気泳動によって観察・判定することによって多型解析 (PCR-*AluI* RFLP) を行った。増幅断片のサイズおよび*AluI*切断パターンに基づきコード番号を付した。

4. コアグララーゼ生化学型

デンカ生研のキットを用いて調べた。

C. 結果

1. MRSAにおけるコアグララーゼ遺伝子型、AG耐性およびAME遺伝子

表3にMRSAのコアグララーゼ遺伝子型 (*coa AluI*-RFLP) の比率と3種のAME遺伝子の保持率を示した。コアグララーゼ遺伝子型は、L21型が83%と圧倒的に多く、2000年以前に分離されたMRSAにおける状況と同様であった。それ以外では、L16が5%、L31が3%、M22が4%、S15が1%、S23が2%、LLが1%であった。80年頃に多く認められたL22型は検出されなかった。*coa*のもも1株あった。

AG耐性に関しては、すべての菌株がABK耐性ということであったが、GMに耐性を示したものは70株(70%)で、いずれも*aac(6')/aph(2'')*を保持するものであった。ABKに耐性 (MIC 4-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を示したのは16株であった。

AME遺伝子プロファイルに関しては、以下のようなことが認められた。L21型の菌株は*aac(6')/aph(2'')*と*aad(4',4'')*の保持率が高く、*aph(3')*は検出されなかった。L31型では、菌株数が少なかったものの、すべてのもので*aac(6')/aph(2'')*と*aph(3')*が検出されたが、*aad(4',4'')*の保持率は33%であった。M22型では、*aac(6')/aph(2'')*と*aad(4',4'')*が高率に検出されたが、*aph(3')*は検出されなかった。これらの結果は、基本的に2000年以前の菌株と同様の傾向であった。

2. コアグララーゼの遺伝子型と生化学型の相関性

表4は、2000年以前の菌株も含めた225菌株のコアグララーゼ遺伝子型と生化学型の相関性を示している。全体的にはすべての生化学型が観察されたが、遺伝子型別に見ると明瞭な偏りが認められた。すなわち、L21ではII型、L22はIV型、L31はII型、M22がVII型、XL21がV型という具合に極端な偏りが認めら

れた。二つの生化学型に割れたのはM12型で、II型とVII型が2:1の比率で検出された。

3. 多剤耐性緑膿菌のAG耐性

表5に試験した多剤耐性緑膿菌のAG耐性プロフィールを示した。MRSAでみられる規則性とは異なる特徴がGM系のAG耐性において認められた。すなわち、KM系のAGに対しては大まかにMRSAと同様の傾向があったが、GM系のAG耐性に関しては、SISOとNTLに関して試験菌に共通して高度耐性で、GMに対しては耐性レベルが低いことが認められた。MRSAのAG耐性に関しては、最も多いのが#25とBG6008のようなパターンで、SISOとGMに関しては耐性レベルが同じというはっきりとした特徴がある。

4. 多剤耐性緑膿菌のAME遺伝子プロフィール

図2に示すように、1株(1672株)を除くすべての菌株において $aph(3')-IIb$ が検出された。検出されなかった1株は、多くのAGに感受性で、KMに関しても低レベルの耐性であった。

$aac(6')$ に関しては、 Ia および Ib ともに2株で検出された。1779株は、チェックした3種のAME遺伝子をすべて有していた。

D. 考察

1. 臨床におけるAG耐性判定について

2003年に東京都のT病院で臨床分離された“ABK耐性”MRSA100株のAG耐性を調べたところ、ABK耐性と判定できたのは10%以下で、大きな矛盾が認められた。

これまでの研究によって、ABKとGMの耐性因子は共通して二機能酵素AAC(6')/APH(2")であることがわかっている(図1)ので、その遺伝子の存否について調べた結果、70%の保持率であった。このことは、耐性因子を保持していない、すなわち、耐性となり得ないものまで耐性と判定していることを浮き彫りにした。この遺伝子を保持するものはすべてGM耐性であったが、聞き取り調査により、GM耐性に関しては一高濃度だけで判定しているために、臨床現場ではGM耐性の判定に関しても問題を抱えていることが明らかになった。

以上のことを踏まえると、ABK耐性やGM耐性の判定精度を向上させるためには、GMに関しては少なくとも $32\mu\text{g/ml}$ の濃度のディスクを採用することが重要であり、また、AAC(6')/APH(2")遺伝子に関してはCD-PCR法によるチェックの導入が必要不可欠と判断される。

2. コアグラーゼ型とAME遺伝子プロフィールについて

コアグラーゼ型およびそれに付随するAME遺伝子プロフィールについては、基本的に90年代以降の特徴に変動は認められなかった。すなわち、コアグラーゼの遺伝子型がL21のものが圧倒的な比率(83%)で存在し、保持するAME遺伝子は $aad(4,4')$ の率が高く(83%)、 $aac(6')/aph(2')$ の率(67%)は他のコアグラーゼ型の菌株より低く、 $aph(3')$ は検出されなかった。他のコアグラーゼ型でも90年代の特徴と同様であった。

コアグラーゼ型とAME遺伝子プロフィールの関係に関して興味深い発見があった。すなわち、コアグラーゼの生化学型が同じII型であるが、遺伝子型が異なるL21とL31(PCR産物のサイズは同じだが、 $AluI$ の切断個所がL21は2ヶ所、L31は3ヶ所)のAME遺伝子プロフィールが明瞭に違うということである。

一般的にこれまで、コアグラーゼに関しては生化学型別に耐性が論じられてきたが、少なくともAG耐性に関しては遺伝子型別に論じていくことが、耐性動向に関してより良い結論を導き出せるものと思われる。

3. 多剤薬剤耐性緑膿菌のAG耐性

多剤薬剤耐性緑膿菌のAG耐性プロフィールは、MRSAで明らかになったことと著しく異なることが明らかになった。すなわち、MRSAのAG耐性は、明瞭な構造-修飾相関が認められたが、緑膿菌においては様相が全く異なっており、MRSAとは異なる因子が複雑な形で関与してAG耐性を形成しているものと判断された。

これまでに、 $aph(3')$ が共通して存在することや多様なAAC(6')が存在することが報告されてきたが、今回の結果でもそのことが裏付けられた。

今回の結果を基に、緑膿菌のAG耐性にAME遺伝子がどのように関与しているのか、また、他の遺伝子の関与の可能性について今後検討していく必要があると思われる。

E. 結論

- 2003年に臨床分離されたMRSAにおけるAG耐性は、90年代以降の傾向を保持しており、ABK耐性化の兆候は認められなかった。
- 臨床現場におけるABK耐性判定に大きな問題点が認められた。

3. ABK耐性判定の精度の向上には、GM耐性試験の適正化と二機能酵素遺伝子 *aac(6')*/*aph(2'')* のPCRチェックが有効不可欠と判断された。
4. 多剤薬剤耐性緑膿菌のAG耐性は、MRSAの様相と著しく異なっており、正しい答えを得るためにはAME遺伝子のみではなく、他の耐性因子も調べて行く必要がある。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 堀田国元： MRSAとアルベカシン耐性化、感染症と化学療法（ラジオたんぱ・アポット感染症アワー・放送内容集）Vol.6, No.7, pp.8-10 (2003)
- 2) 堀田国元、土崎尚史、石野敬子、石川淳： 新しい耐性菌モニタリングの展望－迅速簡便なゲノムモニタリングによる耐性菌の動向予測－，獣医畜産新報 56: 846-849 (2003)

2. 学会発表

- 1) 堀田国元、土崎尚史、石野敬子： MRSAにおけるアミノグリコシド (AG) 修飾酵素遺伝子の菌株局在性とAG耐性。第51回日本化学療法学会。平成15年5月（横浜）
- 2) 石野敬子、土崎尚史、堀田国元： 臨床分離高度アルベカシン耐性MRSAの解析。第51回日本化学療法学会。平成15年5月（横浜）
- 3) 石野敬子、土崎尚史、堀田国元： MRSAのアミノグリコシド耐性におけるAAC(6')/APH(2'')遺伝子の役割と特徴。第32回薬剤耐性菌シンポジウム。平成15年8月（東京）
- 4) 土崎尚史・石野敬子・石川淳・堀田国元： MRSAにおけるアミノグリコシド耐性菌の動向予測 1) コロニーダイレクトPCRによるキー遺伝子の迅速検出と分布動向。平成15年度薬剤耐性菌研究会。平成15年11月（伊香保）
- 5) 堀田国元、土崎尚史、斎藤文子： MRSAにおけるアミノグリコシド耐性菌の動向予測 2) アミノグリコシド抗生物質耐性率とアミノグリコシド修飾酵素プロファイルの相関性。平成15年度薬剤耐性菌研究会。平成15年11月14～15日（伊香保）
- 6) 石野敬子、土崎尚史、石川淳、堀田国元： MRSAにおけるアミノグリコシド耐性菌の動向予測 3) *aac(6')*/*aph(2'')* 保持MRSAに対するアミノグリ

コシド抗生物質の抗菌活性と変異型 *aac(6')*/*aph(2'')* の解析。平成15年度薬剤耐性菌研究会。平成15年11月（伊香保）

- 7) 堀田国元、石野敬子、土崎尚史、石川淳： MRSAにおけるアミノグリコシド耐性菌の動向予測 4) アルベカシン（抗MRSA剤）耐性化の見通し。平成15年度薬剤耐性菌研究会。平成15年11月14～15日（伊香保）

参考文献

1. 堀田国元、石川淳、石井亮一、斎藤文子、吉良清子、荒川宜親、池康嘉： アルベカシン耐性MRSAの判定における問題点とPCR検定の必要性和有用性。Jpn. J. Antibiot. 52: 525-532 (1999).
2. Song, M.D.; M. Wachi, M. Doi, F. Ishino & M. Matsushashi: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett. 221: 167-171 (1987).
3. Rouch, DA; ME Byrne, YC Kong & RA Skurray: The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. J. Gen. Microbiol. 133: 3039-52 (1987).
4. Vanhoof, R; C Godard, J Content, HJ Nyssen & EHannecartpokorni: Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. J. Med. Microbiol. 41: 282-290 (1994).
5. Hookey JV; JF Richardson, BD Cookson: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J. Clin. Microbiol. 36: 1083-1089 (1998).
6. GenBank ACCESSION No. X90856; PA01 genome : AE004828 AE004091.
7. GenBank ACCESSION No. M18967
8. GenBank ACCESSION No. M21682, X60321, S47923

表1. 標的遺伝子とPCRプライマー

標的遺伝子	遺伝子産物	プライマー配列	PCR産物	文献
<i>mecA</i>	PBP2'	Forward: 5'-TGTCGGTAACTGAATCAGC-3' Reverse: 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAG-3'	519 bp	1, 2
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	AAC(6')/APH(2'')	Forward: 5'-TACAGAGCCTTGGGAAGATG-3' Reverse: 5'-CATTTGTGGCATTATCATCATATC-3'	407	1, 3
<i>aph(3')-III</i>	APH(3')-III	Forward: 5'-CTGATCGAAAAATACCGCTGC-3' Reverse: 5'-TCATACTCTTCCGAGCAAAGG-3'	269	4
<i>aad(4',4'')</i>	AAD(4',4'')	Forward: 5'-CTGCTAAATCGGTAGAAGC-3' Reverse: 5'-CAGACCAATCAACATGGCACC-3'	174	4
<i>coa</i>	Coagulase	Forward: 5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG-3' Reverse: 5'-GCTTCCGATTGTTGATGC-3'	?	5
<i>aph(3')-IIb</i>	APH(3')-II b	Forward: 5'-AAGTCGGCCTCGTCCACC-3' Reverse: 5'-TGCAGCCACCTCCATGCC-3'	590bp	6
<i>aac(6')-Ia</i>	AAC(6')-I a	Forward: 5'-CTGCTAATAAATAACTCC-3' Reverse: 5'-TCCAACAATATAATAACC-3'	321	7
<i>aac(6')-Ib</i>	AAC(6')-I a	Forward: 5'-TTGCTGACGTACAGGAAC-3' Reverse: 5'-TACCTTGCCTCTCAAACC-3'	348	8

表2. PCR条件

構成成分	終濃度	MRSA用反応液		緑膿菌用
		耐性遺伝子	coa遺伝子	
10x PCR Buffer	1 x	+	+	+
dNTPs	各0.2mM	+	+	+
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM	+	+	+
DNA polymerase (KOD-Plus-)	0.4U	+	+	+
Primers				
<i>mecA</i> ・ <i>aad(4',4'')</i> ・ <i>aph(3')-III</i> F & R	各0.2 μM	+	-	-
<i>aac(6')/aph(6')</i> F & R	各0.5 μM	+	-	-
<i>aph(3')-II</i> ・ <i>aac(6')-Ia/Ib</i> F & R	各0.2 μM	-	-	+
<i>coa</i> F & R	各0.2 μM	-	+	-
反応液量		20 μl	20 μl	20 μl

反応条件: 95°C, 3分 → (95°C, 30秒 → 50°C, 30秒 → 68°C, 1分) × 30サイクル

表3. コアグラーゼ遺伝子型別AG修飾酵素遺伝子のプロフィール

コアグラーゼ型	00以前修飾酵素遺伝子保持率				03年度分離株修飾酵素遺伝子保持率				
	<i>coa</i> <i>Alu</i> I-RFLP	443株	ac6'/ph2''	ad4'	ph3'	100株	ac6'/ph2''	ad4'	ph3'
L21		76%(337)	42%	91%	0%	83%(83)	(67)%	83%	0%
L22		8 (37)	89	8	49	0 (0)	-	-	-
L31		5 (23)	83	9	9	3 (3)	100	33	100
M22		4 (16)	100	75	0	4 (4)	100	75	0
etc		7 (30)	77	70	0	10 (10)	90	80	0

表4. MRSA におけるコアグラーゼの遺伝子型と生化学型の相関性

遺伝子型	菌株数	生化学型						
		II	III	IV	V	VI	VII	VIII
L21	29	28	0	0	0	0	1	0
L22	35	1	0	34	0	0	0	0
L24	15	10	0	0	3	1	1	0
L31	4	4	0	0	0	0	0	0
M11	13	4	0	0	0	0	0	9
M12	31	21	0	0	0	0	10	0
M22	13	2	0	0	0	0	11	0
M31	9	0	9	0	0	0	0	0
S23	8	0	8	0	0	0	0	0
XL21	12	0	0	0	12	0	0	0
etc.	56	19	7	8	0	3	19	0
	225	89	24	42	15	4	42	9

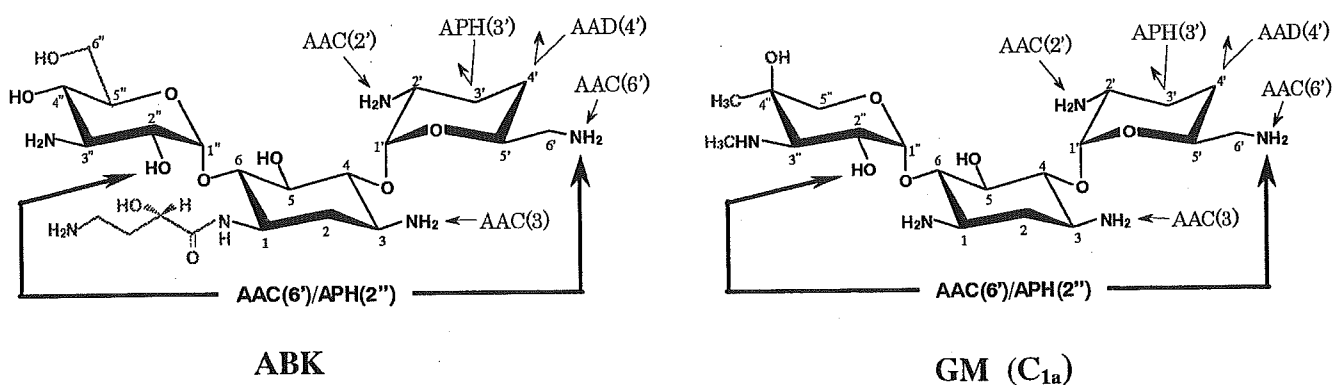


図1. ABKとGMの構造と酵素的修飾部位

表5. 多剤薬剤耐性緑膿菌のアミノグリコシド耐性

菌群	菌株	KM	DKB	AMK	ABK	GM	SISO	ISP	NTL
緑膿菌	1672	16	8	<1	<1	2	2	1	2
	1673	>1024	>1024	128	64	16	>1024	>1024	>1024
	1682	>1024	256	64	8	8	512	512	>1024
	1683	>1024	>1024	64	8	8	>1024	512	>1024
	1708	>1024	512	64	16	8	>1024	512	>1024
	1709	>1024	512	64	16	8	>1024	>1024	>1024
	1710	>1024	>1024	128	16	8	>1024	>1024	>1024
	1721	>1024	>1024	64	256	>1024	>1024	64	>1024
	1732	>1024	512	64	8	8	>1024	512	>1024
	1733	>1024	512	4	8	512	>1024	16	>1024
	1757	>1024	>1024	64	32	8	>1024	>1024	>1024
	1786	>1024	>1024	128	16	8	>1024	>1024	>1024
	1779	>1024	>1024	128	32	512	>1024	>1024	>1024
	MRSA	#25	>1024	128	8	4	128	256	8
BG6008		>1024	128	16	4	128	256	32	16
BG6009		>1024	>1024	128	32	>1024	>1024	256	256
PRC104		>1024	>1024	512	128	256	256	>1024	16

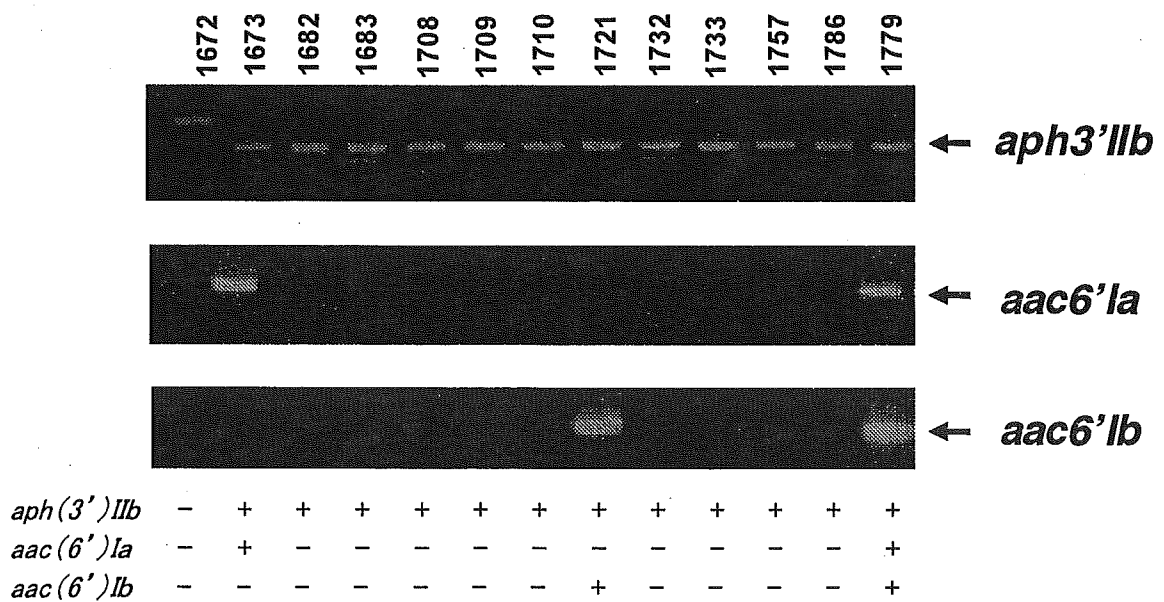


図2. 緑膿菌のアミノグリコシド修飾酵素遺伝子プロファイル

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

AmpC 大量産生株における ESBL の検出方法の確立

分担研究者：山口 恵三 東邦大学医学部微生物学講座

研究要旨 3次元拡散法を利用した β -ラクタマーゼの検出方法の確立を目的に検討を行った。その結果、クラス C に属する β -ラクタマーゼ産生菌と ESBL 産生菌を区別することが可能であることが判明した。さらに、クラス C に属する β -ラクタマーゼが同時に ESBL、あるいはクラス B に属する β -ラクタマーゼを産生した場合でも、それらを区別して検出することができる可能性があることが示唆された。

研究協力者： 木村総一郎
石井 良和
東邦大学医学部微生物学講座

A. 研究目的

現在まで 400 種類を越える β -ラクタマーゼが発見されており、臨床材料から分離される菌株が産生する β -ラクタマーゼを適切に分類することは困難な状況になっている。しかし、薬剤感受性試験あるいは β -ラクタマーゼの検出は、患者に対して適切な化学療法を行うために実施されるべきものであり、それほど複雑な分類が必要ではない。すなわち、実際に臨床で使用されている抗菌薬を用いて、臨床材料から分離された β -ラクタマーゼを産生する菌株にどのような抗菌薬が有効かということを適切に判断するための一助となる方法の確立、およびそのための試験に使用される薬剤を

選択することが重要であると考えている。

現在、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ Extended-spectrum β -lactamase: ESBL の検出法として NCCLS が推奨する方法が一般に使われているが、この方法は *Escherichia coli*、*Klebsiell pneumoniae* および *Klebsiella oytoca* が産生する ESBL の検出を目的としたものである。しかし、臨床材料から分離される ESBL を産生する菌種は全ての腸内細菌科および *Pseudomonas aeruginosa* を含む糖非発酵菌が含まれている。これらの菌種の多くがクラス C に属する β -ラクタマーゼを産生し、且つその酵素の産生量が高い菌株が存在するからである。このような菌株では、いくつかの第三世代