

セフェム系抗菌薬の薬剤感受性が耐性と判定されることから、ESBL 産生株との見分けが困難であることが理由の一つである。しかし、これらの菌種の中にも ESBL を産生するものは当然存在し、ESBL のサーベイランスを実施し、その分布を把握するためにはクラス C に属する β -ラクタマーゼの大量産生株であっても、ESBL 産生の有無を見分ける方法の確立が必須となる。そのために、細菌検査室で実施可能な簡便な方法を確立することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

今回の検討に用いた菌株は精度管理用の 2 菌株、ESBL 産生株 4 株、クラス C に属する β -ラクタマーゼ大量産生株 3 株および今後本邦でも検出される可能性があるクラス A に属するカルバペネム分解酵素産生菌 3 株を用いた。各菌株は Mueller-Hinton Broth(Difco, USA)で一晩培養した後、超音波破碎装置にて菌体を破碎した。破碎後、残りの菌体と破碎された菌体の不溶画分を除いた後、さらにフィルター濾過を行い、得られた溶液を被検粗酵素液とした。Mueller-Hinton Agar (Difco)上にディスク拡散法の要領で *Escherichia coli* ATCC25922 を接種した後、セフォタキシム、セフトジジム、セフェピム、アズトレオナム、イミペネム、セフォタキシム/クラブラン酸、セフトジジム/クラブラン酸の各 KB ディスクをシャーレ中央に配置した。ディスクから約 5mm の距離を置き、滅菌済みのステンレス製のヘラで約 2cm のスリットを

入れた。そのスリットに約 30 μ l の各種被検粗酵素液を注入し、35°Cにて 16 時間培養し、スリットに対して発育する *E. coli* ATCC25922 の発育形態を観察することにより酵素の型を判定した(図 1 参照)。

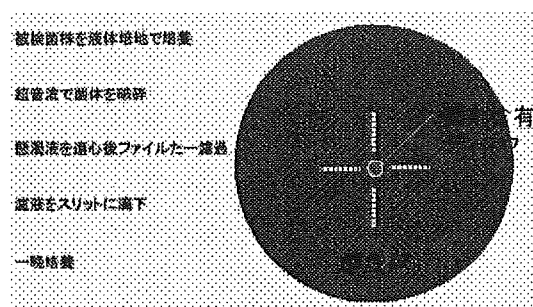


図 1. 実験方法の概要 (ディスクの設置とスリットの作成方法)

C. 研究結果

β -ラクタマーゼを殆ど産生しない、*E. coli* ATCC25922 およびクラス C に属する染色体性 β -ラクタマーゼ(AmpC)を大量に産生する *Enterobacter cloacae* NUH10 の結果を図 1 に示している。スリット周囲の発育を見るとセフォタキシムのディスクおよびセフォタキシム/クラブラン酸ディスクにおいて阻止円に凸が認められる。この現象は当該薬剤が被検粗酵素液で不活化された場合に見られるものである。さらに、阻止円の凸はクラブラン酸による影響をまったく受けていないことから、この現象はクラス A に属する酵素によって引き起こされたものでないことが理解できる。しかし、アズトレオナム、イミペネムあるいはセフェピムディスク周囲では、このような現象がまったく認められないか、ほんの僅かの変化が認められるにすぎない。したがって、

E. cloacae NUH10 が産生する AmpC はこれらの薬剤を殆ど不活化できないことを示している。

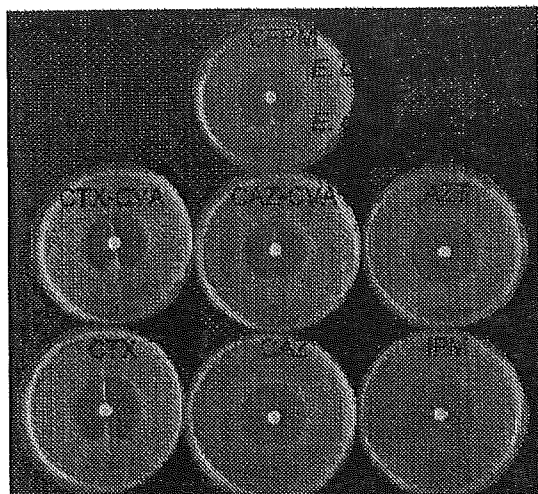


図2 *E. coli* ATCC25922 および *E. cloacae* NUH10 の抽出液をスリットに注入した場合の阻止円の変化

図3には SHV-26、Toho-1、Toho-3 および CTX-M-14 による阻止円の変化を観察している。いずれの酵素もセフトキシムの阻止円を明らかに変形させており、その変形はクラブラン酸の存在によって改善が認められる。この現象は、一般的なクラス A に属する酵素に見られることである。さらに、程度の差はあるもののセフェピムおよびアズトレオナムにおいて Toho-1 を接種したスリットで阻止円の凸が認められる。SHV-26 および Toho-3 ではセフェピムディスクにおいてこの現象が認められなかった。一方、セフトジジムディスクの場合には阻止円の変形が認められなかった。これらは日本でよく認められる ESBL の特徴である。

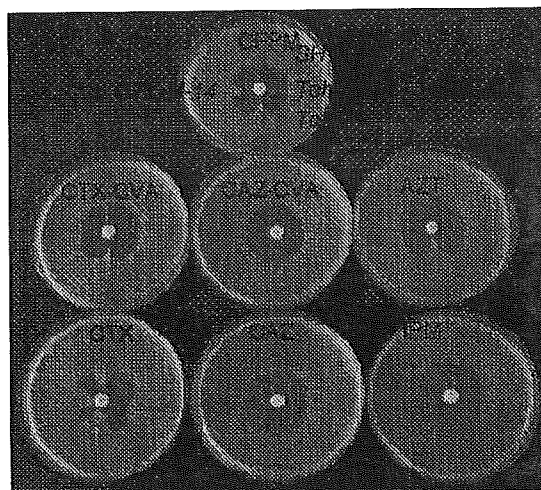


図3 SHV-26、Toho-1、Toho-3 および CTX-M-14 産生株から抽出した菌体破碎液による阻止円の変化

図4には K1 と命名されている β -ラクタマーゼを産生する *K. oxytoca* および AmpC を大量に産生する *E. coli* および *E. cloacae* のパターンを示した。K1 は ESBL のカテゴリーには入らないが、ESBL と同様の基質特異性を示す。そのため、今回の検査方法においても ESBL と区別することができなかった。一方、AmpC 大量産生株では、セフトキシムの阻止円に著しい変形が認められ、その変化はクラブラン酸存在下でも改善が認められなかった。一方、AmpC 大量産生株の阻止円の変形は、アズトレオナムおよびセフェピムディスク周辺において観察されなかった。

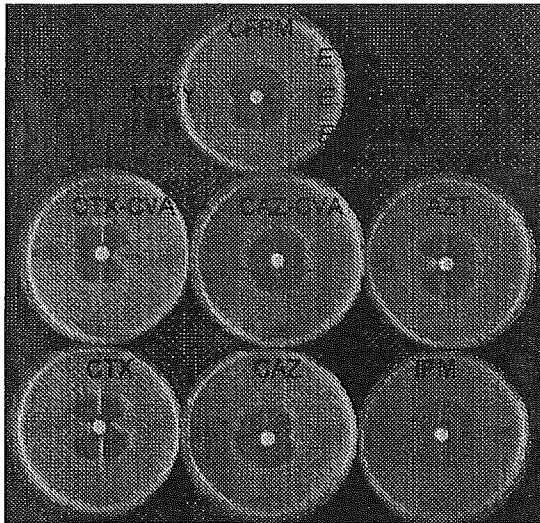


図4 K1を産生する*K. oxytoca*、臨床材料から分離された AmpC を大量に産生する *E. coli* および *E. cloacae* から得られた細胞破砕液による阻止円の変化

クラス A に属するカルバペネム分解酵素産生株からの抽出液が各種 β -ラクタム系抗菌薬ディスクの阻止円におよぼす影響を図5に示した。KPC-1 のイミペネムおよびアズトレオナムにおいて阻止円が観察されなかったが、その後の確認試験では問題なく阻止円の凸が認められている。したがって、本酵素は極めて幅広い基質特異性を有するものであることが推察される。

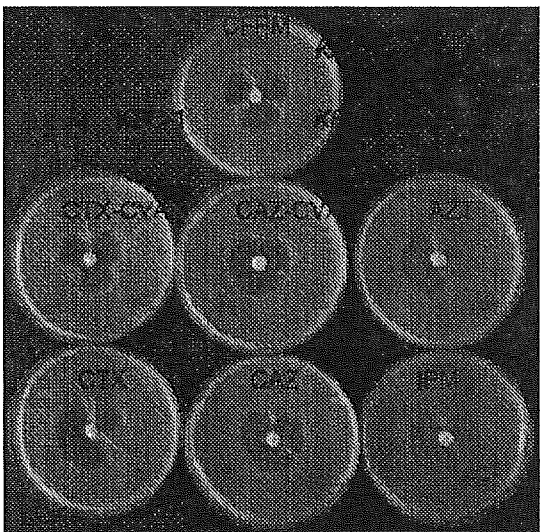


図5 カルバペネム分解型クラス A に属する β -ラクタマ

ーゼ産生株から得られた菌体破砕液による阻止円の変化

D. 考察

臨床分離株が産生する β -ラクタマーゼを検出する際に問題となるのは、一菌株が2種類あるいは3種類以上の複数の β -ラクタマーゼを産生することである。さらに、排出ポンプおよび透過孔となる膜タンパク質の影響が相俟って耐性機構の理解が極めて複雑なものとなっている。このような背景から、不活化酵素による耐性とそれ以外の耐性機構を区別することが可能な方法を確立する必要がある。今回、私たちが実施した、3次元抽出液拡散法を応用した検討から、本方法は染色体性セファロスポリナーゼ大量産生株（AmpC 大量産生株）とクラス A に属する基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ（ESBL）を区別することが可能であることが明らかとなった。しかし、今回の検討だけでは十分とは言えず、より簡便な粗酵素液の抽出方法およびその条件の確立、酵素の分類のための適切な薬剤の選定など要検討事項が見出された。さらに、臨床材料から分離される菌株は、これら2種類の酵素のみならず、クラス B に属するカルバペネム系抗菌薬分解酵素も同時に産生する菌株も少なからず存在する。

次年度の研究ではディスク法を基にした、より精度の高い3次元抽出液拡散法を確立することが望まれる。本方法は、病院の細菌検査室において汎用されているディスク拡散法を基にした方法である。したがって、本方法は普及が容易であり、方法をマニユ

アル化し、その中で使用すべき抗菌薬を適切に選択すれば、どの検査室でも β -ラクタマーゼの型別が簡単に実施できるようになる。その簡単な検査から得ることができる情報は、 β -ラクタマーゼの型別や耐性機序のみならず、適正な抗菌薬選択のために必要なデータを供給することができると思われる。

E. 結論

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、その予備的検討を実施した。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と思われた。この方法は、ディスク法を基にしているため、広く病院の細菌検査質に普及するものと考えられる。

厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

分担研究課題：サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学

分担研究者：山本 友子 (千葉大学大学院薬学研究院)

研究要旨

この10年間、先進諸国において特定の多剤耐性サルモネラ、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 の発生と急増が公衆衛生上の深刻な問題となっている。本研究ではDT104の出現状況と耐性機構並びに多剤耐性獲得機構を解明するために、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*S. enterica* serovar Typhimurium 37株を対象に分子疫学的解析を行い、以下の成果を得た。

- (1) 37株中23株が多剤耐性DT104にみられる5剤耐性をコードしていた。
- (2) β -lactamase のタイプを分類したところ、15株がPSE1 type、5株がOXA1 type、3株がTEM typeの β -lactamaseをコードしていた。
- (3) PSE1 typeのうち14株が *Int11-aadA2-qacE Δ 1-sul Δ 1* と *int11 Δ -pse1-qacE Δ 1-sul* を有し多剤耐性領域は既知の strain 96-5227 と同様の構造であると考えられた。
- (4) OXA1 typeは、すべてが *int11-oxa1-aadA1* のインテグロンを有していたが、これらのファージ型を検討したところすべてDT104以外のものであったことから、他のサルモネラDTにおいても新たな耐性遺伝子の獲得と蓄積による多剤耐性化が進行していると考えられた。

研究協力者

内村眞佐子、依田清江 (千葉県衛生研究所)

渡辺治雄、泉谷秀昌 (国立感染症研究所)

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、染色体上の *Salmonella* Genomic Island (SGI)1 と名付けられた領域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。かかる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た。

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。β-lactamase の活性はヨード法により測定した。PCR, Pulse field gel electrophoresis (PFGE), Southern blotting、ファージ型別は常法に従った。

C. 研究結果

- (1) 37 株中 23 株が多剤耐性 DT104 にみられる Ampicillin (Ap), Streptomycin (Sm), Sulfonamide (Su), Chloramphenicol (Cm), Tetracycline (Tc) 耐性を有し、さらに、Kanamycin, Trimethoprim, Nalidixic acid (Nx) 耐性が加わったものが存在した。又、Cm, Sm, Su 耐性株 1 株および Sm, Su 耐性株が 12 株存在した。
- (2) 全塩基配列が公開された DT104 strain 96-5227 の耐性遺伝子(MDR)領域は、2つの class I インテグロンすなわち *Int11-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1* と *int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul* により挟まれて構築されている。この構造を参考にして上記 Ap, Sm, Su, Cm, Tc 耐性 23 株について、β-lactamase Typing、PCR Mapping、Southern Hybridization、PFGE、ファージ型別を行い以下のことを明らかにした。15 株が PSE1 type、5 株が OXA1 type、3 株が TEM type の β-lactamase をコードしていた。PSE1 type のうち 14 株が *Int11-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1* と *int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul* を有し、MDR は strain 96-5227 と同様の構造であると考えられたが、PFGE pattern は 5 タイプに分かれたが、10 株は strain 96-5227 と同一のパターンを示した(図 1)。又この中には DT104 以外のファージ型が 2 株存在したことから、SGI1 の水平伝播が起きていると考えられた。1 株は *int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul* と他の class I インテグロンを有していたが MDR 領域全体の構造は異なっており、MDR の再配列が起きていると考えられた。

OXA1 type は、すべてが *int11-oxa1-aadA1* のインテグロンを有していたが、PFGE pattern は 4 タイプに分かれた(図 2)。これらのファージ型を検討したところすべて DT104 以外のものであったことから、他の DT サルモネラにおいても新たな MDR による多剤耐性化が進行していることが懸念される。

(3) 同時期に分離された SE68 株の薬剤耐性を検討したところ、Tc 耐性 1 株、Nx 耐性 1 株、Sm 耐性 45 株であった。

D. 考察

DT104 は、1984 年英国で最初に家畜から分離されたが、以来英国での分離例は徐々に増加し、特に 90 年代に入ってから爆発的に増加して死亡例もでた。この例をはじめとして、90 年以降 DT104 は欧州や北米地域で急速な広がりをみせた。1996 年にカナダで分離された DT104 strain 96-527 の MDR の塩基配列(2001 年に公開)を参考に、今回分離した DT104 の MDR の構造を解析したところ、15 株中、14 株がほぼ同一の構造を有していることが明らかとなった。PFGE 及びファージタイピングの結果から、起源を同一にする耐性菌の蔓延にあわせて、MDR の水平伝播が起きていると考えることができる。一方、*Int11-oxa1-aadA1-qacEΔ1-sul1* インテグロンを有する耐性菌が 5 株検出されたが、これらは異なる PFGE を示したことから、新たなタイプの MDR の増加が懸念される。又、現在の所 SE での多剤耐性化は進んでいないと考えられた。

表 1 Characteristics of the 20 Typhimurium isolates harboring the class 1 integron

Year	Phage type	Integron	Designation
1998	Not DT104 related	<i>[Int11-oxa1-aadA1-qacEΔ1-sul1]</i>	CK653
1999	DT104	<i>[int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[Int11-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1]</i>	CK2 CK4 CK7 CK8 CK9 CK10 CK11
	Not DT104 related	<i>[int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and unidentified class 1 integron	CK657
	Not DT104 related	<i>[Int11-oxa1-aadA1-qacEΔ1-sul1]</i>	CK3 CK6 CK658
2000	DT104	<i>[int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[Int11-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1]</i>	CK15 CK16 CK17
	Not DT104 related	<i>[Int11-oxa1-aadA1-qacEΔ1-sul1]</i>	CK23
2001	DT104	<i>[int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[Int11-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1]</i>	CK26 CK28
	DT104B	<i>[int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[Int11-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1]</i>	CK25
	U302	<i>[int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul]</i> and <i>[Int11-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1]</i>	CK30

[int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul] and *[Int11-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1]*: 14/23 isolates

[int11Δ-pse1-qacEΔ1-sul] and unidentified class 1 integron: 1/23 isolates

[Int11-oxa1-aadA1-qacEΔ1-sul1]: 5/23 isolates

图1 PFGE Analysis of XbaI-digested genomic DNA from serovar Typhimurium isolates

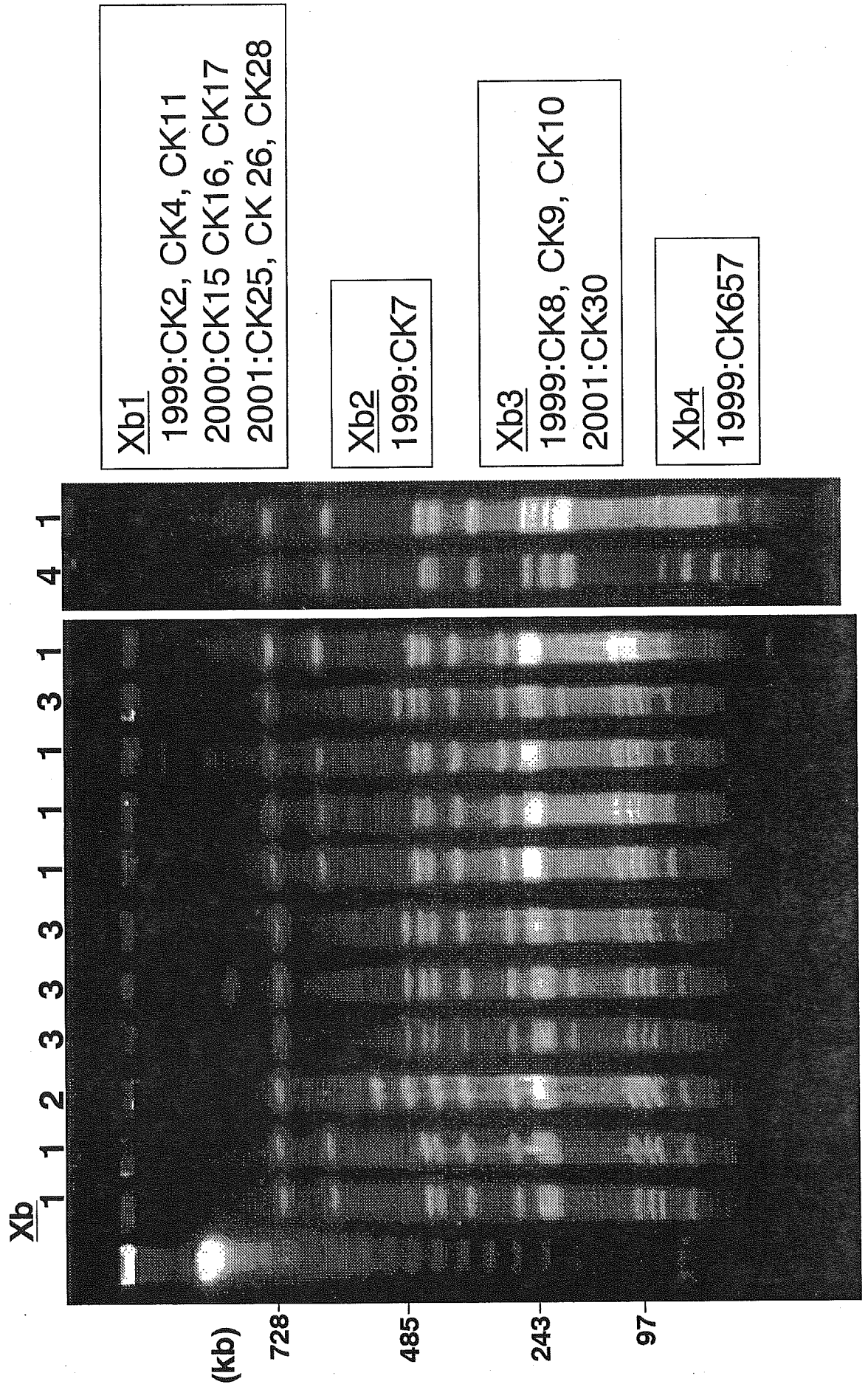
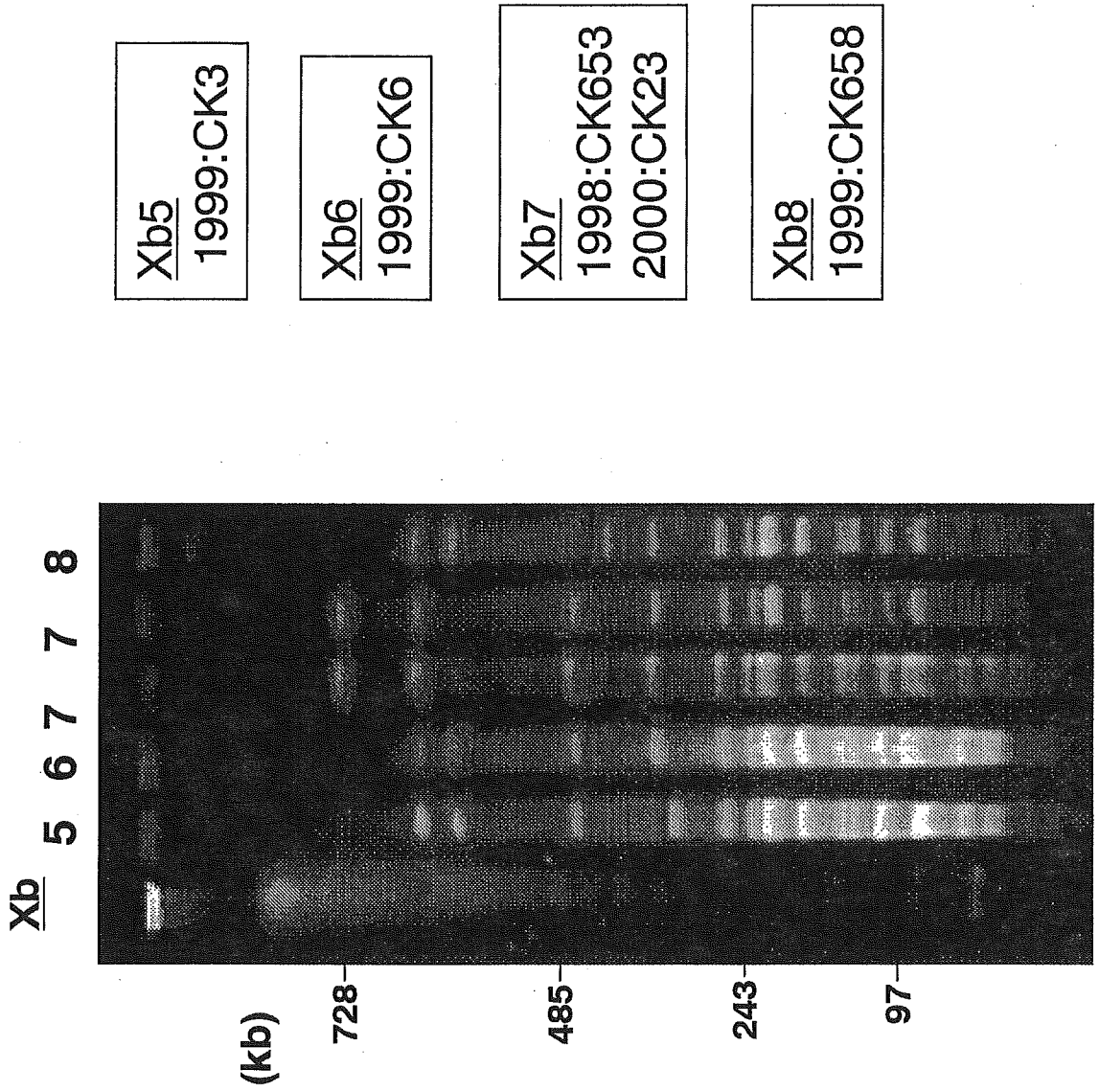


Figure 2 PFGE Analysis of XbaI-digested genomic DNA from serovar Typhimurium isolates



新型の薬剤耐性菌のリファレンス並びに薬剤耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法に関する研究

PCR-RFLP 法を利用したニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌の *gyrA* 変異のスクリーニング法の検討

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌第一部 部長

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

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剤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剤(LVFX, SPFX, TFLX)を 14 日間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剤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剤の効果がみられない症例が論文や学会で数多く報告されている。日本にもニューキノロン系抗菌剤に低感受性を示すチフス菌・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。このような腸チフスではニューキノロン系抗菌剤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、速やかに適切な抗生物質の投与が行えるよう、このような低感受性菌を治療開始前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。

2. 方法

本研究では、腸チフス・パラチフスの診断・治療の迅速化に貢献するため、治療という観点から、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 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標とする。従来の感受性ディスク法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中間もしくは感受性と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 の測定は複雑な手技を要するため実用的ではない。そのため本研究では MIC 測定より迅速で簡単な PCR 法を用いた検出法の確立を目標にしている。

現在までの研究から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てある。これらの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。この点突然変異を PCR-RFLP(Restriction fragment length polymorphism)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。まず PCR 法により、*gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅した。その後、PCR 産物の 10 μ l を別のチューブに移し、*HinfI* を加えて 1 時間 37 度におき切断した。その後、15%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で PCR 産物の切断パターンを観察した。

3. 結果

ニューキノロン系抗菌剤に低感受性を示すチフス菌・パラチフス A 菌は *gyrA* 遺伝子に突然変異を持っていることが私たちの現在までの研究で明らかになっている。ニューキノロン低感受性株では、DNA ジャイレースをコードする GyrA の 83 位または 87 位のアミノ酸のいずれかに点突然変異によるアミノ酸置換が起っていた。ニューキノロン低感受性株のトポイソメラーゼ IV の遺伝子(*parC*)には点突然変異によるアミノ酸置換は見られなかったため、低感受性菌の感受性の決定は *gyrA* 遺伝子の突然変異の有無によることが考えられた。そこで、私たちは、GyrA の 83 番または 87 番の点突然変異を PCR-RFLP 法によりスクリーニングする方法を開発した。この方法により *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域の DNA 配列決定作業をすることなく迅速に変異の入っている場所を知ることができる。この方法を用いてニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌臨床分離株で変異のパターンを調べたところ、試験したすべての株で変異の入っている場所を特定することができた。また、切断パターンの比較によってニューキノロン耐性株、ニューキノロン低感受性株、ニューキノロン感受性株との区別もすることができた。また、この方法により、ニューキノロン感受性株、低感受性株、耐性株のスクリーニングをわずか 3 時間程度の短時間ですることができた。

4. 考察

ニューキノロン低感受性株の耐性のメカニズムは、ニューキノロン剤の標的酵素である DNA ジャイレースまたはトポイソメラーゼ IV の遺伝子の特定の場所に点変異が入ることにより起こることがすでに報告されている。点変異によるアミノ酸置換が起こることで、ニューキノロン剤の DNA ジャイレースまたはトポイソメラーゼ IV への結合を阻害し、薬剤の効果を低下させている。すべてのニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌では、GyrA の 83 位または 87 位のいずれかにアミノ酸置換が起っている。さらに、83 位と 87 位の 2 重変異を持つものはさらに高度な耐性を獲得する。本研究では、PCR-RFLP 法で感受性株、低感受性株、耐性株をスクリーニングできる方法を確立することができた。この成果は、腸チフス・パラチフスのニューキノロン低感受性株を迅速にスクリーニングし、治療の開始前の適切な抗生物質の選択に大いに貢献できると考えられる。

5. 研究発表

Hirose, K., Tamura, K., Watanabe, H.

Screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism.

Microbiol. Immunol. 47, 161-165, 2003.

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). (Review)
Research Advances in MICROBIOLOGY, 2003, vol. 3, p108-117.

Ⅲ. 班會議抄錄

平成15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」 班会議

研究発表プログラム

期日 : 平成15年11月15日(土) 9:00-15:00

場所 : 森秋旅館 会議室

住所 : 群馬県北群馬郡伊香保町 60

TEL : 0279-72-2601

PCを用いて発表される演者の方へお願い

1. 各自のパソコンを発表にご使用下さい。
 - パソコンを持参されなかった方、不安のある方は、ご相談下さい。
2. 発表待ち中、発表中に省エネ設定によって画面が消えることがないように設定をお願い致します。
 - Windows XPの場合、コントロールパネル→パフォーマンスとメンテナンスから電源オプションをひらき、《モニターの電源を切る》《システムスタンバイ》などを全て[なし]に設定して下さい。
 - Windows 2000、Me、98の場合、コントロールパネルから電源の設定、電源の管理、電源オプションなどをひらき、《モニターの電源を切る》《システムスタンバイ》などを全て[なし]に設定して下さい。
3. 次演者の方は、前の演者の発表が始まり次第、次演者席におつき下さい。
 - 次演者席の液晶モニターに画面が出ることを確認した後、ケーブルを切り替え器に接続します。この操作中、この後は、発表の終わるまで電源を切らないようお願い致します。次演者席にはAC電源(コンセント)を用意します。発表中も引き続きご利用頂けます。
4. 投影に障害が発生した場合は、大変に恐縮ですが障害の回復にご協力をお願いいたします。

事務局

プログラム

検査・疫学・院内感染 (9:00 - 10:45)

座長 富田治芳 (群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学)

1. メタローβ-ラクタマーゼの蛍光プローブの開発

○黒崎博雅、山口佳宏、後藤正文 (熊本大大学院医学薬学研究部)

2. 肺炎例からの検査材料を用いた PCR 法による *Mycoplasma pneumoniae* の迅速診断の有用性と検出菌の薬剤感受性

諸角美由紀、生方公子、ARD 研究会 (北里大学大学院・感染制御科学府)

3. 化膿性髄膜炎例から分離された *Streptococcus pneumoniae* の耐性遺伝子解析

— 1993 年から 2002 年の分離株について —

千葉 菜穂子、長谷川 恵子、砂川 慶介、生方 公子、「化膿性髄膜炎・全国サーベイランス研究班」(北里大学大学院・感染制御科学府)

4. 化膿性髄膜炎例より分離された *Haemophilus influenzae* の遺伝子解析

長谷川 恵子、生方 公子、砂川 慶介、「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究班」(北里大学大学院・感染制御科学府)

5. 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)

座長 和田昭仁 (国立感染症研究所 細菌第一部)

6. 院内感染アウトブレイク時における対応

鈴木里和^{1,2}、吉田英樹²、砂川富正³、大山卓昭³、谷口清州³、岡部信彦³、蒲地一成¹、

荒川宜親¹ (¹国立感染症研究所 細菌第二部、²国立感染症研究所 実地疫学専門家養成コース、³国立感染症研究所 感染症情報センター)

7. ヒト由来多剤耐性 *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* の分子疫学

高屋明子¹、友安俊文¹、小関千愛¹、内村眞佐子²、依田清江²、○山本友子¹

(¹千葉大・院薬・微生物薬品化学、²千葉県衛研)

*** コーヒーブレイク (10:45 - 11:00) ***

グラム陰性菌 (11:00 - 11:30)

8. 臨床分離緑膿菌における抗菌薬耐性への多剤排出システム MexAB-OprM および MexXY-OprM の重要性と検出法考案についての試み

後藤 直正、隈下麻美、門野愛美、尾崎 徹、村田 健、西野 武志 (京都薬大・微生物)

9. 同一患者より分離された *Helicobacter pylori* におけるクラリスロマイシン耐性株、感性株の遺伝学的関連性の解析

金井京子^{1,2}、柴山恵吾¹、荒川宜親¹

(¹ 国立感染症研究所・細菌第二部、² 東京理科大学大学院・薬学研究科)

グラム陽性菌およびアミノ糖耐性 (11:30 - 12:30)

座長 柴田尚宏 (国立感染症研究所 細菌第二部)

10. 16S rRNA メチレーズ遺伝子保有株の分離方法とその保有状況について

山根一和、和知野純一、土井洋平、八木哲也、柴田尚宏、柴山恵吾、加藤はる、荒川宜親

(国立感染症研究所 細菌第二部)

11. 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

土崎尚史、石野敬子、石川淳、堀田国元 (国立感染症研究所生物活性物質部)

12. 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

石野敬子、土崎尚史、石川淳、堀田国元 (国立感染症研究所生物活性物質部)

13. VanD 型バンコマイシン耐性 *Enterococcus raffinosus*

○野村隆浩¹、谷本弘一²、小澤良之¹、丸山英行³、荒川宜親⁴、池 康嘉^{1,2}

(¹ 群馬大院・医・細菌感染制御、² 群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設、

³ 済生会習志野病院・細菌検査、⁴ 国立感染研・細菌第二部)

*** 昼食 (12:30 - 13:30) ***

β -lactamase (13:30 - 15:00)

座長 堀田国元 (国立感染症研究所生物活性物質部)

14. *Klebsiella pneumoniae* より同定されたセファマイシン分解性・阻害剤抵抗性を有する GES 型 class A

β-ラクタマーゼの解析

○和知野 純一^{1,2}、土井洋平¹、山根一和¹、柴田尚宏¹、八木哲也¹、甲斐久美子¹、
荒川宜親¹ (¹国立感染症研究所 細菌第二部、²名古屋大学大学院医学系研究科)

15. *Citrobacter freundii* 由来プラスミド性 AmpC β-lactamase の解析

○中野竜一、兼子謙一、須田和美、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)

16. Class C β-lactamase を多量産生する臨床分離 *Enterobacter cloacae* の遺伝子解析

○兼子謙一、中野竜一、中野百実子、須田和美、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)

17. グラム陰性桿菌における CTX-M-型β-ラクタマーゼの型別とインテグラーゼ遺伝子保有状況の調査

柴田尚宏、山根一和、土井洋平、和知野純一、八木哲也、黒川博史、荒川宜親
(国立感染症研究所 細菌第二部)

18. CTX-M-2 型 β-ラクタマーゼ産生性 *Proteus mirabilis* 感染症の院内流行

○長野由紀子¹、斉藤優子¹、長野則之¹、柴田尚宏²、荒川宜親²
(¹船橋市立医療センター 検査科微生物、²国立感染症研究所 細菌第二部)

メタロ-β-ラクタマーゼの蛍光プローブの開発

(熊本大大学院医学薬学研究部) ○黒崎博雅, 山口佳宏, 後藤正文

【序論】メタロ-β-ラクタマーゼはカルバペネムを含む幅広いβ-ラクタム剤を加水分解しかつ临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-ラクタマーゼ産生の有無を確認することは初期段階での治療において極めて重要である。メタロ-β-ラクタマーゼの活性中心には複核の亜鉛が存在する。我々はこの亜鉛イオンと特異的に結合するチオール基と蛍光色素 (ダンシル基) を含む DansylCnSH (n=2-6) を合成し(図 1)、蛍光法によるメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の検出法を検討した。

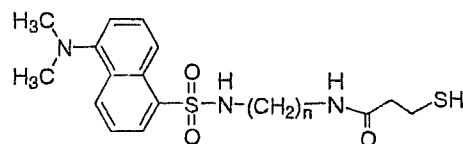


Fig.1. Structure of DansylCnSH (n=2-6)

【実験】1 μM の DansylCnSH (n=2-6) と等モルの IMP-1 を混合し蛍光スペクトルを測定した。次に、1 μM の DansylCnSH (n=2-6) 溶液に IMP-1 溶液を段階的に適宜加え、同様に蛍光強度を測定し解離定数 K_d 値を求めた。また、基質をニトロセフィンとして DansylCnSH (n=2-6) による IMP-1 活性阻害を測定し拮抗阻害の回帰曲線にあてはめ阻害定数 K_i 値を求めた。

【結果・考察】図 2 に一例として DansylC2SH の IMP-1 非存在下および存在下での蛍光スペクトルを示す。340 nm で励起させると DansylCnSH (n=2-6) は 540 nm で発光し、これに IMP-1 を徐々に加えていくと蛍光強度は増大しかつ蛍光強度ピークは 525 nm にシフトした。IMP-1 との解離定数 K_d は 356 nM (n=2), 975 nM (n=3), 67 nM (n=4), 154 nM (n=5), 105 nM (n=6) となり、阻害定数 K_i は 1100 nM (n=2), 1300 nM (n=3), 140 nM (n=4), 280 nM (n=5), 160 nM (n=6) となり、 K_d と K_i の値はほぼ一致した。

同一条件下、1 μM の DansylCnSH (n=2-6) にアルブミンまたは活性中心に亜鉛 1 個を含むカーボニックアンヒドラーゼを添加しても蛍光強度の増大は観測されなかった。

DansylCnSH (n=2-6) はメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的に結合し、タンパク質側鎖との相互作用により蛍光が増大することが示された。

さらに、DansylC4SH と IMP-1 との複合体の結晶化と X線結晶構造解析に成功したので X線結晶構造も報告する。

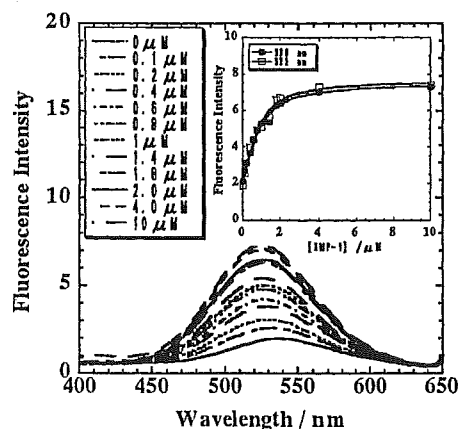


Fig.2. Fluorescence spectral changes of DansylC2SH (1 μM) on addition of metallo-β-lactamase (IMP-1) in 50 mM Tris Buffer (pH 7.4, 0.5M NaCl, 10%MeOH) at 25 °C and plot of Fluorescent Intensities at 538 nm and 522 nm vs. [IMP-1].

表題：肺炎例からの検査材料を用いたPCR法による*Mycoplasma pneumoniae*の
迅速診断の有用性と検出菌の薬剤感受性

北里大学大学院・感染制御科学府 諸角美由紀，生方公子，ARD 研究会

[目的]

M. pneumoniae は原発性異型肺炎の起炎菌として知られる。本菌は一般細菌が有する細胞壁を有しておらず、培養の難しい菌のひとつであることから培養がほとんど行われなくなっている。このような培養に時間を要する微生物に対する PCR 法が注目されている。当研究室では、呼吸器感染症の主要な起炎菌である肺炎球菌やインフルエンザ菌と同時に、培養困難なこのような微生物をも PCR 法によって検索するシステムの構築を検討している。この発表においては、それらの成績の中から肺炎例を対象とした *M. pneumoniae* に対する PCR および培養による成績と、その臨床所見にみられる特徴、症例の年齢分布、薬剤感受性と耐性菌の出現について報告する。

[方法]

肺炎と診断された小児例(n=369)より採取された上咽頭ぬぐい液は、PPLO液体培地中へ十分に混釈し、5,000 rpm, 5 minの遠心を行った。上清部分を捨て去り、沈渣50.1として均一化した後、その5.1を溶菌用に用いた。次いで、2.1の溶菌液をPCR反応液(30.1)へ加えてPCRを実行した。PCRは94°C:15sec, 53°C:15sec, 72°C:15secの条件で35サイクル実行した。PCR用primerは16S rRNAの配列に基づき設計した。検査材料の処理から結果を得るまでの所要時間は約2.6時間である。培養による菌検索は定法に従った。培養できた*M. pneumoniae*のマクロライド薬とニューキノロン薬に対する感受性を測定し、耐性が疑われた菌株は遺伝子解析を行った。

[結果・考察]

肺炎369症例のうち68例(18.4%)がPCRによって*M. pneumoniae*陽性と判定された。抗体価測定が実施された57例のうち、1例を除いたすべての症例において抗体価は有意に上昇していた。一方、PCRでは陰性であったが、抗体価測定によって上昇が確認された症例が20例(5.4%)認められたが、それらの症例には*M. pneumoniae*に有効なマクロライド系薬が数日間投与された後に検体採取が行われた例が多かった。

M. pneumoniae のマクロライド系薬に対する感受性 (MIC₉₀)は、EM:0.0156 . g/ml, CAM:0.0156 . g/ml, AZM:0.000975 . g/mlと優れ、このようなマクロライド系薬が1日でも投与されると、PCRによる検索は陰性となることが判明した。

MIC測定を実施した株の中にマクロライド系薬耐性と推定された株が2株認められた。EM, CAM, AZMのMICはすべて16 . g/mlで、本来の感性菌が示す感受性よりも1,000倍以上MICが低下していた。この耐性菌は23S rRNAドメインVの2063番目のadenineがguanineに変異していた。LVFXのMIC₉₀は1 . g/mlで耐性菌は認められなかった。

症例における臨床所見の特徴を解析すると、*M. pneumoniae* 陽性例のWBC値、CRP値、および年齢分布は、肺炎球菌やインフルエンザ菌が起炎菌とされた肺炎例とは明らかに異なっていた。菌検索に*M. pneumoniae*のPCR法を加えることは、呼吸器感染症の起炎菌を推定する上で極めて有用であり、さらには治療薬の選択に際しても有益であると結論された。