

表題：化膿性髄膜炎例から分離された *Streptococcus pneumoniae* の β -lactam 薬耐性遺伝子解析
1993年から2002年の分離株について

北里大学大学院・感染制御科学府 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」

[目的]

耐性肺炎球菌, すなわち PISP, PRSP による重症呼吸器感染症や化膿性髄膜炎の増加は世界的にも問題となっている。私達は本邦におけるそれら耐性菌の疫学調査を行い, 適切な初期治療薬の選択と迅速診断確立のために, 「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究班」を組織し, 研究活動を行っている。今回は今までに収集された菌株に対する注射薬感受性, 耐性遺伝子解析, 病原性と関わりのある莢膜血清型について報告する。

[方法]

1993年から2002年の10年間に化膿性髄膜炎例から分離された肺炎球菌286株と, 髄液のPCRを直接実施し, 起炎菌が肺炎球菌であると診断された18例の合計304例を解析対象とした。各施設からの菌株の収集とその解析結果の報告は, 共同研究者が述べたとおりである。被験菌株に対する薬剤感受性は寒天平板希釈法によって実施し, ペニシリン結合蛋白(PBPs)の遺伝子変異の有無はPCRにて検索, 血清型別は型別用抗血清(Statens Serum Institute, Denmark)を用いて莢膜膨化試験によってサブタイプまで判定した。

[結果・考察]

PCRによる *pbp1a*, *pbp2x*, および *pbp2b* 遺伝子変異とPCGに対する感受性から, 被験菌は, (i) 3遺伝子に変異を持たない PSSP (23.1%, MIC₉₀:0.031 μ g/mL), (ii) *pbp2x* 単独変異 (19.9%, 0.063 μ g/mL), (iii) *pbp2b* 単独変異 (0.7%, 0.125 μ g/mL), (iv) *pbp2x+2b* 変異 (5.9%, 0.25 μ g/mL), (v) *pbp1a+2x* 変異 (10.5%, 0.25 μ g/mL), (vi) 3遺伝子に変異を認める株の PRSP (39.9%, 2 μ g/mL) に識別された。(ii)~(v)の株はPISPとした。過去3年間の分離株とそれ以前の株とを比較すると, *pbp2x* 変異株の割合は有意に上昇していた。PRSPによる発症率は, 成人(27.1%)に比べ, 小児(45.3%)において明らかに高かった。

PRSPに対する各薬剤の抗菌力(MIC₉₀)はPAPM (0.125 μ g/mL) > BIPM (0.25 μ g/mL) > MEPM = VCM (0.5 μ g/mL) > CTX (1 μ g/mL) > CTRX (2 μ g/mL) > ABPC (4 μ g/mL) > CTM (8 μ g/mL) の順に優れていた。なお, 過去3年間に分離されたPRSPの中には, PCGやCTXに大多数のPRSPが示すMICよりもさらにMICの高い株がわずかながら認められた。

小児由来株の血清型は, 6B (25.4%), 19F (19.0%), 23F (13.8%), 6A (10.1%), および14型(7.9%)が多く, PRSPはこれらの血清型に優位であった。一方, 成人由来株では23F (16.5%), 22 (12.4%), 3 (11.3%), 6B (10.3%), 19F (9.3%) および10と14型(6.2%)が多く, 小児株との間に有意な差が認められた ($p=0.0000$ (**))。

耐性度の高いPRSPの出現は, 重症呼吸器感染症や髄膜炎の治療に際してさらに難渋することも予測される。分子レベルでの正確なサーベイランスの継続が求められている。

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

北里大学大学院・感染制御科学府 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」

[目的]

小児化膿性髄膜炎例における原因菌の50%は*H. influenzae* type b (Hib)である。近年、本菌の中にBLNAR (β -lactamase-nonproducing ampicillin (ABPC)-resistant *H. influenzae*)と呼ばれる耐性菌が急速に増加している。BLNARにおける耐性機構は、 β -lactam系薬の作用標的である細胞壁合成酵素のうち、隔壁合成に関わるPBP3をコードする*ftsI*遺伝子上に変異が生じたものである。化膿性髄膜炎由来株のうち、BLNARとBLPACR (β -lactamaseと*ftsI*変異を同時に保持する株)について、*ftsI*遺伝子を解析すると同時に、PFGEを実施し、本邦における化膿性髄膜炎由来株の分子レベルでの疫学解析を行った。それらについて報告する。

[方法]

対象とした*H. influenzae*菌は、1999年1月から2002年12月末までの4年間に「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究」に参加する全国226医療機関の細菌検査室を通じ担当医了解の元に分離と同時に送付を受けた395株である。これらの菌株には到着後ただちにPCRによる耐性遺伝子解析がなされ、検査室で参考データとして各施設へ返却された。また、BLNARの*ftsI*遺伝子の塩基解析を行った。PFGE解析は定法に従い*Sma*I酵素を用いて実行した。

[結果・考察]

395株の*H. influenzae*菌内訳は、PCRによる遺伝子解析では感性菌が115株、TEM-1型 β -lactamase産生菌が61株、軽度耐性BLNAR (Low-BLNAR)が121株、BLNARが55株、BLPACR Iが36株、およびBLPACR IIが7株であった。

55株のBLNARに対する*ftsI*遺伝子の解析結果は、Asn₅₂₆、Lysへの置換と、保存性アミノ酸配列Ser-Ser-Asn周囲にみられるMet₃₇₇、Ile、Ser₃₈₅、Thr および Leu₃₈₉、Pheを有する株が35株と最も多かった。次いで、Arg₅₁₇、HisとSer₃₈₅、Thrの2ヶ所のアミノ酸置換を有する株が9株認められた。その他の異なるタイプのアミノ酸置換も認められ、変異のタイプ別に分類すると、6つのサブグループに識別された。耐性菌に対する注射薬の感受性は、ABPCが1~8 . g/ml、CTXが0.25~2 . g/ml、MEPMが0.125~0.5 . g/mlであった。耐性レベルは保存性アミノ酸配列(SSN)の周囲にアミノ酸置換が挿入されるほど上昇すると考えられた。

PFGEの成績では、BLNAR、BLPACR IIも含めて、極めてhomologousなPFGEパターンを示した。同時期に肺炎例から分離されたBLNARは、多様なPFGEパターンを示していた。上述した成績は、同一クローンのHib-BLNARが薬剤の選択圧を受け変異を繰り返しながら全国へ拡散しつつあることを示唆している。

このような耐性菌の増加は、適切な治療方法の確立と共に、Hibワクチンの早期実施、および継続的な分子疫学研究が必要であることを示している。

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。

チフス菌・パラチフス A 菌の海外からの輸入事例から薬剤耐性菌が分離されている。チフス菌では、日本国内事例からは薬剤耐性菌はほとんど分離されていないが、インド亜大陸、タイへの渡航者からアンピシリン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン(TC)、ストレプトマイシン(SM)、ST合剤(ST)の5剤に耐性を持つ多剤耐性チフス菌が分離されている。パラチフス A 菌においては多剤耐性菌はほとんどみられないものの、CP、SM、STなどの1つの薬剤に耐性の株が増加してきている。腸チフス、パラチフスには抗菌剤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剤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)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剤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。これらは NCCLS のブレイクポイントから判定すると、ニューキノロン系抗菌剤に耐性ではない。しかし、ニューキノロン系抗菌剤に対する MIC が感性株の約10倍またはそれ以上高い。また、ナリジクス酸に耐性で、第3世代セフェム系抗菌剤には感受性である。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剤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剤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。ニューキノロン系抗菌剤の効果が望めない症例では第3世代セフェム系抗菌剤(CTX, CTRXなど)が使用される。現在のところ、第3世代セフェム系抗菌剤に耐性をもつチフス菌・パラチフス A 菌は報告されていない。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。2000年では、日本で分離されるチフス菌の36%、パラチフス A 菌の31%が、2001年では、チフス菌の25%、パラチフス A 菌の43%がニューキノロン低感受性菌であった。今後、腸チフスの治療には直ちにニューキノロン系抗菌剤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。低感受性菌がさらに高度な耐性を獲得し完全な耐性菌となるとニューキノロン剤は無効となる。このような耐性菌が現れ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だろう。

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

感染症アウトブレイク時は、対策（介入）と疫学調査の2本柱での対応がとられる。また対策は、アウトブレイクを確認したと同時に実施されるものと、疫学調査の結果を踏まえた将来的な予防策に分けられる。

院内感染のアウトブレイクの発生を把握した直後には、まずはそれ以上の症例の発生を防止するためにその時点で考えられる原因への迅速な対策が必要である。これには標準予防策の徹底といったものから、場合によっては新規入院や手術の延期、病棟の一時的な閉鎖などが考えられる。その後、疫学調査による感染源や感染経路の解明に伴って有効かつ長期的に実行可能な将来的予防策が実施されることが望ましい。

院内感染のアウトブレイク調査では医療記録の閲覧、医療スタッフに対する聞き取り調査、入院患者の保菌状況や環境調査といった細菌学的検査が主要な情報となる。医療記録はしばしば膨大な情報を含んでいるため、過去の事例や菌の性質などを考慮し効率的に情報を収集する必要がある。また耐性菌の院内感染では細菌学的検査の結果が非常に重要であるため、アウトブレイクの把握後は可及的速やかに検体の確保に努めることも調査上の留意点である。これらの情報を系統立てて記述し、感染源・感染経路や危険因子に関する仮説を策定したのち、コホート研究、症例対照研究といった解析疫学的手法および細菌学的検査による分子疫学的手法で仮説を検証する。最終的には感染源・感染経路の特定とそれを踏まえた提言の作成をもって疫学調査終了とする。

院内感染の疫学（Hospital Epidemiology）には医療制度や医療に対する文化が関わっており国によってさまざまな特徴がある。疫学が異なれば感染対策も異なってくるため、海外の院内感染対策を直輸入してもわが国の現状にそぐわないこともありうる。今後わが国において、より有効かつ実践的な院内感染対策を講じるためには、海外のデータを有効に利用しながらも、サーベイランスとアウトブレイク時の疫学調査によってわが国独自の薬剤耐性菌の疫学を明らかにし、根拠をもって実践的な院内感染対策を提言していくことが必要と思われる。

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

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最も重要なものの一つである。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多剤耐性DT104の増加が報告されている(Tamada et al., 2001 J. Clin. Microbiol. 39:1057, Izumiya et al., 2001 J. Clin. Microbiol. 39:2700)。多剤耐性DT104の特徴は、複数の耐性遺伝子が染色体上の*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である。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、新たなSGIの存在、さらにSGIの水平伝搬の可能性と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。

今回我々は、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株を対象に分子疫学的解析を行った。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およびSm, Su耐性株がそれぞれ1株存在した。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 *IntI1-aadA2-qacEΔ1-sulΔ1*と *intI1Δ-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2個のインテグロンを有し、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。1株は2個の*intI1*を有していたがMDR領域の構造は異なっていた。OXA1 typeは、すべてが*intI1-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。*intI1-oxa1-aadA1*によるMDR構築の可能性を検討中である。

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株であり、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。

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

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

[はじめに] 緑膿菌の染色体上のポリシストン性の遺伝子群にコードされたマルチコンポーネント型排出システムが、本菌の抗菌薬耐性、さらには多剤交差耐性の一因として機能していることが知られてきた。PAO1 株のゲノム配列プロジェクトの成果は、計 12 種類のマルチコンポーネント型排出システム遺伝子群の存在を示唆した。これらの多剤排出システムのうち、MexAB-OprM は野生株でも発現し、アミノ配糖体薬を除く抗菌薬を広く排出すること、さらに MexXY-OprM は抗菌薬の存在によって誘導的に発現し、アミノ配糖体薬を含む抗菌薬を排出することを実験室株の変異株シリーズを用いて明らかにしてきた。本研究では、緑膿菌感染症の化学療法に欠くことのできないキノロン薬、アミノ配糖体薬およびカルバペネム薬に対する耐性への排出システム MexAB-OprM および MexXY-OprM の貢献を臨床分離株を用いて調べ、抗菌薬耐性菌出現の現状を排出システムのメンから解析した。また、排出システムの検出法について検討した。

[研究材料と方法] 臨床各科から分離した緑膿菌 104 株を材料に用いた。排出システムの発現は既報のウサギ抗 MexB、抗 OprM および抗 MexX 特異抗血清を用いた免疫ブロット法と定量的 RT-PCR によって行った。また、遺伝子の破壊はすでに報告した相同的組み換え法により行った。また、抗菌薬感受性は寒天平板希釈法により測定した。

[結果および考察] MexXY-OprM は野生株では発現していないが、オペロンの上流の *mexZ* 遺伝子の変異により発現し、キノロン薬やアミノ配糖体薬を排出し、これらの抗菌薬耐性に寄与する。臨床各科から分離され、アミノ配糖体薬(amikacin および tobramycin)やキノロン薬(levofloxacin, norfloxacin および sparfloxacin)に種々の感受性を示す緑膿菌株での MexXY-OprM の発現を免疫ブロット法により調べたところ、27 株(26%)で発現が検出された。しかし、意外なことに MexX の構成的発現ではキノロン薬に対する耐性度が高かったが、アミノ配糖体薬に対する耐性度は低く、両抗菌薬で異なることが分かった。この原因を調べるために、norfloxacin や tobramycin を含む寒天培地で臨床分離株を培養し、MexX の発現を調べたところ、norfloxacin 含有培地での増殖によっては MexX の発現率は増加しなかったが、tobramycin 含有培地では非構成的発現株 77 株のうち 57 株(74%)で MexX の発現が検出された。これらの結果は MexXY の発現は感受性測定時にアミノ配糖体薬によって誘導されていることが、キノロン薬ではそれが起こっていないことが分かった。さらに、*mexX* 遺伝子の破壊によりキノロン薬やアミノ配糖体薬の感受性化が観察された。これらの結果から MexXY-OprM 排出システムがキノロン薬やアミノ配糖体薬に対する耐性に寄与することだけでなく、従来、キノロン耐性の中心的役割を担う排出システムが MexAB-OprM であると考えられてきたが、それに加えて、MexXY 発現の動向も調べてゆくことが必要であることが示された。また、現在、排出システムの発現検出を特異抗体を用いて行っているが、汎用性に問題があると考えられる。そこで、特異抗体に頼らない定量的 RT-PCR の適用を変異株シリーズで検証し、さらに臨床分離株への適応を試みている。この点についても結果を報告する。

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

Helicobacter pylori 感染者は欧米などの先進国では約 20-30%、発展途上国では 70-90%、日本では 50-60%と報告されている。近年、治療薬の一つであるクラリスロマイシン(CAM)に対する耐性菌の出現が報告されている。臨床分離株の中で約 10%前後が CAM 耐性株であるとされ、我々が過去に行ったスクリーニングでも耐性株の割合は 61 株中 4 株(6.6%)であった。*H. pylori* のマクロライド系薬剤に対する耐性機序は、現在のところ薬剤の標的である 23S rRNA の遺伝子の点変異(2142G または A2143G)が主であると考えられている。臨床から分離された CAM 耐性株 8 株における我々の予備的調査でも、全ての株で A2142G または A2143G が確認されている。これら CAM 耐性 *H. pylori* のスクリーニングの過程において、同一患者より CAM 耐性株(MIC, 32 μ g/ml)と感性株(MIC, <0.125 μ g/ml)を同時に分離したので、それらの株の遺伝学的関連性を解析した。

耐性株、感性株の *flaA*、*ureAB*、*ureCD*、*cagA* 遺伝子について PCR-RFLP パターンの解析を行ったところ、両株のパターンは同じであった。また、23S rRNA 遺伝子の塩基配列は、耐性株が A2143G の変異を有していた他は両株とも全く同じであった。*H. pylori* は遺伝学的に非常に多様であると言われている。そこで、PCR-RFLP パターンおよび 23S rRNA 遺伝子の塩基配列を他の臨床分離株 15 株について比較したところ、それらは非常に多様で、由来の異なる株で全く同一のパターンを示すものは存在しなかった。この結果から、今回解析を行った CAM 耐性菌と感性菌は、同じ株から由来している可能性が高いと考えられた。*H. pylori* は他の菌種に比べて遺伝子の変異が非常に起こりやすいこと、また一般的に一人の人間の胃内に感染する *H. pylori* は複数の系統の株からなることが知られている。マクロライド系薬剤の投与により耐性株が選択され増殖するものと考えられているが、これらの株が分離された患者では、遺伝的に由来の異なる感性菌と耐性菌が最初から独立して存在していたのではなく、胃内での長期持続感染の間に、CAM 投与の影響で感性株より 23S rRNA 遺伝子に変異を獲得した耐性株が生じ、薬剤濃度の低い局所に生き残った感性株と共存していたものと考えられる。

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)

【背景】これまでグラム陰性菌から分離された 16S rRNA メチレーズは *rmtA*, *rmtB*, *armA* の 3 種類が知られている。いずれの酵素も臨床で用いられるアミノグリコシド(AG)のほとんどが属する 4,6-disubstituted deoxystreptamine group に対して高度(MIC >1,024 µg/ml)の耐性を示す。我々は 16S rRNA メチレーズを保有する株のスクリーニング方法と検出方法を検討し、さらに 16S rRNA メチレーズの保有状況を調査した。

【方法】臨床で広く用いられグラム陰性菌の薬剤感受性検査で比較的ルーチンに測定がなされている amikacin (AMK)と gentamicin (GM)の両方に MIC >32 µg/ml 以上の株を選択した。この 2 種類の AG に耐性の修飾酵素は AAC(6') group があるためさらに arbekacin (ABK)の MIC >32 µg/ml 以上の条件を加えた。これらの条件を満たす株に対して 3 種類の 16S rRNA メチレーズに特異的な PCR probe で PCR 反応を施行した。以上の検査を *Pseudomonas aeruginosa* 549 株、*Serratia marcescens* 339 株、*Escherichia coli* 505 株、*Klebsiella pneumoniae* 443 株、*Enterobacter spp.* 326 株について試行した。

【結果】3種類の AG の MIC が >32 µg/ml 以上となった株は *P. aeruginosa* 2 株、*S. marcescens* 2 株、*E. coli* 2 株の合計 6 株であった。これらの株に 3 種類の PCR プライマーによって 16S rRNA メチレーズを保有しているか調べたところ全ての株で陽性で、その内訳は *rmtA* は *P. aeruginosa* の 2 株、*rmtB*, *armA* はそれぞれ *S. marcescens* と *E. coli* の 1 株ずつであった。3 種類の AG が MIC >32 µg/ml 以上で PCR が陰性の株は認められなかった。

【考察】臨床でグラム陰性桿菌の治療に用いる AMK と GM に加えて特殊な修飾酵素でしか不活化されない ABK を組み合わせることによって 16S rRNA methylase 産生株を簡単に分離可能であることを確認した。この方法を用いる事により比較的容易にスクリーニングを行うことがほぼ可能と思われる。さらに PCR 法を用いることによって既知の 3 種類の 16S rRNA メチレーズの型別を確定することは可能であるため、多くの施設で試みられたい。

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

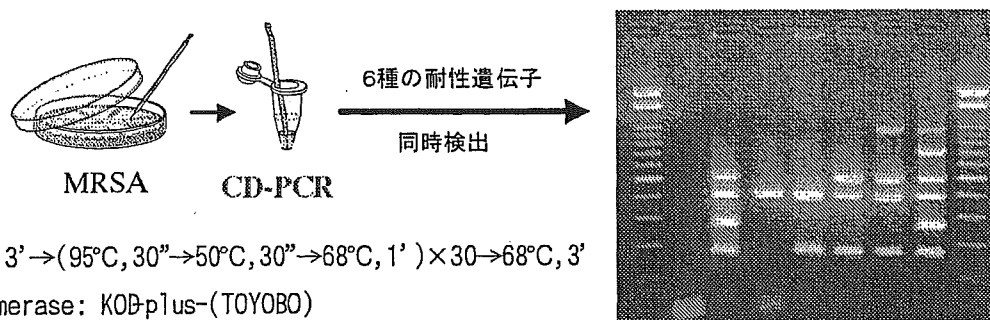
国立感染症研究所生物活性物質部

ゲノム情報を基にしたキー遺伝子の簡便検出法の確立により、調査対象耐性菌（感受性菌も含めて）の耐性遺伝子プロファイルおよび菌種特異的な遺伝子の迅速なモニタリングが可能となる。その情報に、耐性スペクトル、耐性因子と抗生物質の応答に関する情報を重ねることにより耐性菌の動向予測も可能となると思われる。このような考えから、MRSAにおけるアミノグリコシド（AG）耐性菌の動向予測のための第一歩として、AG修飾酵素遺伝子、*mecA* 遺伝子およびコアグララーゼ遺伝子型を簡便迅速に調べる方法をColony Direct Multiplex PCRおよび*coa A1uI*-RFLPによって確立し、MRSAにおけるこれらの遺伝子の分布について経年的な調査を行なった。

図1に6種の遺伝子のプロファイルを一度にチェックできるColony Direct Multiplex PCR法を示したが、以下のことがキーポイントとして浮かび上がった。① 高性能なDNA polymeraseを用いる：最近の改良型DNA polymeraseは良いが、初期の*Taq*などは問題あり。② 反応液への添加菌量をごく少量に抑えること：目に見えない程度の量（ $10^4 \sim 10^6$ cfu/反応液）で十分（菌体添加量が過剰になると反応が阻害される）。

コアグララーゼ遺伝子に関しては、3' 末端領域の繰返し配列をColony Direct PCRで増幅後、*A1uI*による切断パターンから遺伝子型別を恣意的に行なった。

1980年頃から2000年までに臨床分離された400株以上のMRSAを調べた結果、80年代は、コアグララーゼ遺伝子型に4種のメジャーな型がダイナミックに変動しながら分布していたが、90年代になると1種類の型（L21）の寡占状態（90%）となっていることが認められた。AG修飾酵素遺伝子プロファイルは、コアグララーゼ遺伝子型によって特徴が認められた。AGの天敵ともいえる二機能酵素遺伝子*aac(6')/aph(2'')*の分布はいずれの型においても高頻度であったが、L21型では約40%と他の型（77%以上）に比べて顕著に低いことが特徴的であった。



95°C, 3' → (95°C, 30'' → 50°C, 30'' → 68°C, 1') × 30 → 68°C, 3'
 polymerase: KOD-plus-(TOYOBO)

Gene	Enzyme	Product	Resistance conferred	Primer sequence
<i>mecA</i>	PBP2'	519 bp	Methicillin and other β -lactams	F: 5'-TGTCCGTAACCTGAATCAGC-3' R: 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAG-3'
<i>aad(9)</i>	AAD(9)	1000	SPCM	F: 5'-CAAGAAAAGTTCTCGTTCGG-3' R: 5'-TCCTTCCCCTTATCATCAC-3'
<i>aad(6)</i>	AAD(6)	750	6-OH: SM	F: 5'-CTTTAGCAGAACAGGATGAAC-3' R: 5'-AGGCATAATGAAGCCTTTCC-3'
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	AAC(6')/APH(2'')	407	6'-NH ₂ / 2''-OH: all AGs	F: 5'-TACAGAGCCTTGGGAAGATG-3' R: 5'-CATTTGTGGCATTATCATCATATC-3'
<i>aph(3')-III</i>	APH(3')-III	269	3'-OH: KM, (AMK, ISP)	F: 5'-CTGATCGAAAAATACCGCTGC-3' R: 5'-TCATACCTTCCGAGCAAAGG-3'
<i>aad(4',4'')</i>	AAD(4',4'')	174	4', 4''-OH: KM, DKB, AMK, ISP	F: 5'-CTGCTAAATCGGTAGAACG-3' R: 5'-CAGACCAATCAACATGGCACCC-3'

図1. Colony Direct Multiplex PCR

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

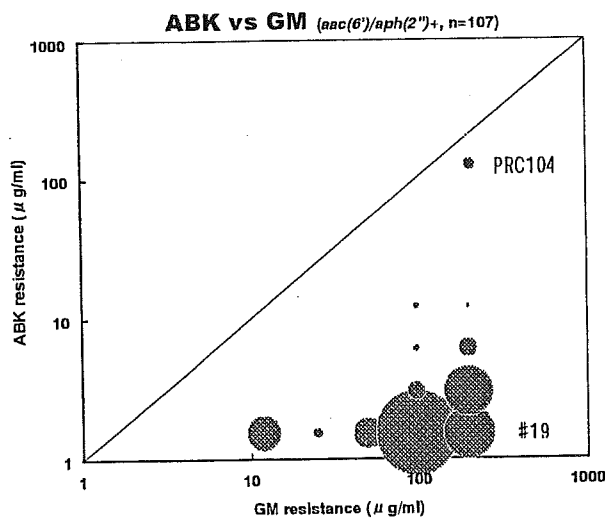
国立感染症研究所生物活性物質部

*AAC(6')/APH(2'')*はGM, SISO, NTL およびABKに対する唯一の耐性要因と判断されるが、一般的にABKに対してはリン酸化(2'-OH)しにくく、アセチル化(6'-NH₂)しても不活性化に至らないことから、*aac(6')/aph(2'')* 保持 MRSA はすべてGM 耐性であってもABK 耐性を示すものは数%でしかも低い耐性レベルに留まっている。

データベース化した情報を基に、*aac(6')/aph(2'')* 単独保持MRSA 菌株のAG 耐性について、横軸にGM、縦軸に他のAG (KM系とGM系) の耐性レベルをプロットして比較したところ、1位のアミノ基を特異な側鎖と置換した半合成AG (AMK, ABK, ISP, NTL) の抗菌活性がGMより高い(特にABKは4~5管) ことが明らかとなった(図1参照)。このことは、*aac(6')/aph(2'')* と *aad(4',4'')* の両方を保持するMRSA 菌株においても明瞭に認められた。これらの結果から、MRSA においてはアミノグリコシドの耐性菌対策の進歩が見事に反映されていることがわかる。

図1のプロットにおいて耐性傾向が一般的な菌株(従来型)と明らかに異なる菌株PRC104から *aac(6')/aph(2'')* をクローン化してAG 抗生物質のアセチル化とリン酸化の活性、遺伝子配列およびmRNA レベルなどについて調べた。その結果、従来型と比べてABK に対するリン酸化活性が高く、基質特異性が変化していること、APH(2'') 領域に1アミノ酸置換を伴う1塩基置換が遺伝子上で起きていることが確認された。

PRC104株は、GM とABK に対する耐性が同等レベルであることが大きな特徴であり、これまでにこのようなABK 耐性MRSA は報告がないことから、今後の動向に注意をする必要がある。



PRC104	228	158	1158	261	261	(ABK)
#19	158	4	1158	261	261	(ABK)
GM _μ ABK _μ <i>aac(6')/aph(2'')</i> APH _μ 阻性						

図1. 変異型 (PRC104) と従来型 (#19) の性状

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}
群馬大院・医・細菌感染制御¹、同薬剤耐性菌実験施設²、済生会習志野病院・細菌検査³、
国立感染研・細菌第二部⁴

【はじめに】

現在までのところ6種類のバンコマイシン耐性遺伝子群が知られている。そのうち臨床
上問題になるのは高度バンコマイシン耐性を示す A、B、D 型である。今回、世界的にも
数株しか報告のない VanD 型 VRE が初めて日本で分離されたので解析を行った。

【方法】

2000年9月に原疾患として糖尿病を持つ73歳男性の両下肢壊死褥創部及び便より分離
されたバンコマイシン耐性の腸球菌属を解析した。各種キット並びに16S rRNAのシーク
エンス解析により菌種を同定した。MICは寒天希釈法により決定した。接合伝達は一晩培
養された供与菌と受容菌を用い固形培地上で行った。一夜培養された供与菌と受容菌を
10 μ lずつ固形培地上に重ねてスポットし、終夜培養後エーゼにて掻き取り選択培地上に塗
布した。Southern Hybridization や Northern Hybridization には非 RI 系を用い、プロ
ーブには PCR により増幅された断片をアガロースゲルから抽出して用いた。

【結果と考察】

分離された菌株は同定の結果 *E. raffinosus* であった。MIC 測定の結果は VCM(1024 μ
g/ml)、TEIC(256 μ g/ml)、GM(2048 μ g/ml)、KM(2048 μ g/ml)、SM1024 μ g/ml)、
EM(2048 μ g/ml)、TC(256 μ g/ml)、ABPC(32 μ g/ml) であった。CP には感受性だった。

バンコマイシン耐性の型別を行うために *vanA*、*vanB*、*vanC*、*vanD1*、*vanE* に特異的
なプライマーを用いた PCR を行ったが陰性であった。そこで大腸菌の *ddlA*、*ddlB* と VRE
の *vanA* 型 ligase の間で保存されているアミノ酸配列から設計されたプライマーを用い
て PCR を行ったところ、増幅された DNA 断片を検出することができた。PCR に用いた
プライマーで直接シークエンスをしたところ *vanD4* と高い相同性が確認された。VanD4
型の VRE は1株報告があり、その塩基配列を参考に作成したプライマーを用いて PCR や
シークエンスを行いリガーゼ遺伝子の残りの塩基配列を決定した。その結果、1032 塩基中
2 塩基 (362 番目の G が T に、930 番目の C が T) が変化していた。コードされるアミノ
酸は 121 番目の Gly が Val に変化したのみで、2 番目の変異によってアミノ酸は変化しな
かった。この結果から、この *E. raffinosus* が VanD4 型の VRE である事がわかった。

接合伝達実験を行ったがバンコマイシン耐性は伝達しなかった。また、プラスミドの分
離を試みたが明らかなプラスミドの存在が確認できなかった。このことからバンコマイシ
ン耐性遺伝子群は染色体上に存在している事が考えられた。バンコマイシン耐性遺伝群の
発現はバンコマイシンによって誘導される事が知られているので Northern Hybridization
を行い VanD 遺伝子の転写を調べたところ。この VanD4 遺伝子群はバンコマイシン非存
在下でも発現しており、恒常的に発現している事がわかった。

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
(国立感染症研究所 細菌第二部¹、名古屋大学大学院医学系研究科²)

【目的】 インテグロン構造に担われた class A β -ラクタマーゼ遺伝子は現在までに VEB 型、GES 型の 2 系統が報告されている。今回我々は、国内ではじめて GES 型 β -ラクタマーゼ遺伝子を同定したのでその解析を行った。

【対象と方法】 NICU で分離された 6 株のセフトジジム(CAZ)耐性 *K. pneumoniae* 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 GES 型の class A 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 6 株中 5 株は *bla*_{GES-3} を、残り 1 株は *bla*_{GES-3} と比べ Ω -loop 内にアミノ酸の置換を有する *bla*_{GES-4} を保有していた。そこでこれらの遺伝子をクローニングし、 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 カラムにて精製した酵素を用いた。さらに、6 株の遺伝学的背景の解析には PFGE を用いた。

【結果と考察】 GES-3 と GES-4 では Ω -loop 内の 170 番目のアミノ酸が異なっていた(GES-3:Gly, GES-4:Ser)。セファマイシン系及びカルバペネム系抗菌薬の MIC は、GES-3 産生株と比べ GES-4 産生株で高く、さらに GES-4 産生株はクラブラン酸、スルバクタムなどの β -ラクタマーゼ阻害剤に抵抗性を有した。またこれらの違いは酵素学的パラメータにおいても裏づけられた。両遺伝子はクラス 1 型のインテグロンに担われておりその周辺構造はほぼ同一であった。PFGE により今回解析した 6 株は遺伝学的に近縁であることが判明した。一般にセファマイシン系抗菌薬は class A 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 GES-4 β -ラクタマーゼは class A に属するにも関わらず明らかな分解能を有した。 Ω -loop 内の変異によりセファマイシン系抗菌薬分解性を獲得した class A β -ラクタマーゼ遺伝子が同定されたのは世界でこれが初めてである。

GES-3 産生株と GES-4 産生株は近似した PFGE パターンを示す事から、おそらく、GES-3 産生株がセファマイシンなどに晒された結果、その中から G170S 置換を獲得した β -ラクタマーゼを産生する株が選択され GES-4 産生株として増殖し分離されたものと考えられる。GES-4 産生株はセファマイシンに耐性を示ししかも阻害剤に抵抗性を示す事から、AmpC 型、CMY-型などと鑑別が難しく、 β -ラクタマーゼの型別を推定する際には、それらの存在を念頭に置く必要がある。

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

【目的】

近年、腸内細菌群よりプラスミド性 AmpC β -lactamase を産生する菌が出現し、国内外で次々と報告されている。当教室保存の臨床分離菌よりペニシリン・セフェム系薬に耐性を示す *Klebsiera pneumoniae* から *Escherichia coli* K-12 株にプラスミド pKU631 上にコードされた β -lactamase が接合伝達することが分かった。そこでこの耐性遺伝子の性状と発現機構を解明し、その出現背景を探ることを目的とした。

【方法】

(1)MIC は日本化学療法学会標準法に準じて行った。(2)接合伝達及び形質転換は *E. coli* KU2900 を受用菌として、(3) β -lactamase の酵素活性は UV 法で検討した。(4)塩基配列を決定するためにクローニングは pKU631 を *Bam*HI、*Bgl*II で消化し、その断片を vector pBC の *Bam*HI site に挿入し、pKU641 を得た。

【結果と考察】

(1)*E. coli* KU2900 への伝達株 KU6501 の MIC は ABPC>128 μ g/ml、CPDX 64 μ g/ml、CTX 及び CMZ は 4 μ g/ml、CAZ 8 μ g/ml、AZT 2 μ g/ml、CFPM \square 0.063 μ g/ml であった。(2) KU6501 の産生酵素は CET を基質にした時 0.49unit/mg protein であったが、ABPC、CTX に対しては活性が見られなかった。これらのことから pKU631 上には AmpC β -lactamase 産生遺伝子の存在が推定された。(3)そこで pKU631 のサブクローン pKU641 の塩基配列を決定した結果、*Citrobacter freundii* 由来であるプラスミド性 AmpC β -lactamase の CMY-4 をコードしていることが分かった。(4) この pKU641 の *bla*_{CMY-4} 上流に IS の挿入が確認された。このことは染色体性 AmpC β -lactamase 遺伝子がプラスミド化する構成の一部を示すものと推測された。海外同様プラスミド性 AmpC β -lactamase の拡散が危惧される。

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

【目的】

第3世代のセファロスポリン系薬(以下 CEPs)に対して高い MIC を示すグラム陰性桿菌が臨床から広く分離されている。In vitro の系にて変異菌を分離した報告から、第3世代 CEPs に対して MIC の上昇した *Enterobacteriaceae* の多くは、class C β -lactamase 産生量が多いことが明らかとなっているが、CEPs 耐性臨床分離菌の遺伝子的な背景については殆ど解析が行われていない。

本研究では、第3世代 CEPs 耐性の臨床分離 *Enterobacter cloacae* において、如何なる遺伝子変異が class C β -lactamase の多量産生に関与しているかについて、class C 酵素の調節遺伝子である *ampD* 及び *ampR* を中心に検証した。

【方法】

臨床分離 *E. cloacae* は、CAZ の MIC が 16 μ g/ml 以上を示す 22 株を用いた。これに、*E. coli* K12 株(KU1)由来の野生型 *ampD* をクローニングしたプラスミド(pKU420)を形質転換し、野生型 *ampD* の共存株と非共存株とで酵素量及び MIC を比較した。MIC 及び酵素量の比較は、常法を用い測定した。Class C 以外の β -lactamase 遺伝子の検出には PCR 法を用いた。各遺伝子の DNA 塩基配列の解析には ABI310 を用いた。

【結果・考察】

E. cloacae 22 株の酵素産生量を調べた結果、pKU420 を共存させた内の 21 株で class C β -lactamase 産生量が有意に低下した。特に 21 株中 18 株では、CET を基質としたときの酵素活性が 0.1 unit/mg protein 以下と感受性菌レベルにまで低下した。また、pKU420 共存下でも酵素量が感受性菌に比べ高い株を 3 株(KU6334, 6343, 6344)確認した。うち KU6334 及び 6343 では *ampR* に点変異を確認し、それぞれ R86S 及び T64I であった。これら変異 *ampR* をクローン化し感受性菌(KU3262)に形質転換したところ、その酵素活性はいずれのクローンでも 1 unit/mg protein と元株に比べ 20 倍程度に上昇した。また、同様の実験を *ampD* 変異株でも行ったところ、変異型 *ampR* を共存させることで酵素量が上昇した。

以上の結果から、臨床分離 *E. cloacae* の CEPs 耐性菌の多くでは、*ampD* 変異株が優先的に選択されていることが明らかとなった。また、*ampD* や *ampR* のような各調節遺伝子の変異が重複することも、CEPs に対する高度耐性化の要因となっていることが示された。

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

国立感染症研究所 細菌第二部

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

【目的】近年、欧米では、TEM・SHV型などいわゆるESBL(基質拡張型β-ラクタマーゼ)を産生する株が増加し問題となっているが、我が国では、黒川によってTEM-91、SHV-24など新型のβ-ラクタマーゼも発見されているもののこの種のESBL産生株は未だ稀である。しかし、国内の臨床現場では、Toho-1型が最初に発見されるなど、CTXに高い分解活性を示すもののCAZなどを殆ど分解できないCTX-M型β-ラクタマーゼが多く分離される傾向がある。一方、IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子のようにCTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子の一部もインテグロン構造に随伴して媒介されていることが海外で報告されつつあるが、我が国での保有状況は明らかでない。今回の我々の調査では、我が国におけるCTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌分離状況を明らかにするとともに、CTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌を対象にインテグラーゼ遺伝子の保有の有無、型別を試みたので報告する。

【対象と方法】2002年1月から2003年9月までに当研究所に耐性遺伝子検査依頼のあった1,034株のうちCTXのMIC値が64 µg/ml以上の菌株で、Twin test (ディスク拡散法) (黒川ら)にて、クラブラン酸の共存により耐性が低下する菌株237株 (18都道府県、45施設)を対象にPCRを行った。CTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子検出プライマーは、CTX-M-1型、CTX-M-2型、CTX-M-8型、CTX-M-9型特異的プライマーの4種類を用いた。また、2002年度検出株79株に関しては、インテグラーゼ遺伝子保有状況を調べるために、インテグラーゼ遺伝子検出用プライマーにクラス1型、2型および3型インテグラーゼ遺伝子特異的プライマーを用いPCRを行った。

【結果と考察】Rにて検出したCTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌は総数237株 (*Escherichia coli* 110株、*Proteus mirabilis* 71株、*Klebsiella pneumoniae* 34株、*Serratia marcescens* 9株、*K. oxytoca* 4株、*Acinetobacter baumannii* 4株、*Citrobacter freundii* 2株、*C. koseri* 1株、*Enterobacter cloacae* 1株、*E. aerogenes* 1株)であった。クラス1型(*intI1*)、2型(*intI2*)、3型(*intI3*)インテグラーゼ遺伝子特異的プライマーを用いてPCRを行った。*intI1*保有株は58株 (73%)であったが、*intI2*および*intI3*保有株はなく、いずれも陰性だった株は、21株であった。最近の報告では、インテグロン構造の下流にORF513遺伝子とβ-ラクタマーゼ遺伝子が配置されていることが明らかとなっているが、今回の結果は、そのような株とともにインテグロンに随伴しないCTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子も相当存在する可能性が示唆された。インテグロンは、一般的にアミノ配糖体耐性遺伝子を媒介する事が多く、また国内分離株では、メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子を伴う事例も多く、今後の動向に注意する必要がある。

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³, 荒川宜親²
船橋市立医療センター 検査科微生物¹, 国立感染症研究所 細菌第二部²

【目的】*Proteus mirabilis* は尿路感染症の主要な原因菌の一つであると共に院内感染症の重要な原因菌で、且つ患者からの除菌が時に困難である。本菌の臨床分離株から検出される最も優位なESBLsはTEM由来であるがCTX-M型酵素が報告されるようになり临床上懸念すべき問題となってきた。本報ではCTX-M-2型β-ラクタマーゼ産生性*P. mirabilis*感染症の院内流行情例について、分子疫学的解析並びに患者の臨床背景調査を行った結果を報告する。

【材料及び方法】2001年7月～2002年8月の期間に、船橋市立医療センター泌尿器科病棟において入院患者16名及び同時期に入院歴を有する外来患者3名の尿とその関連部位から分離された多剤耐性*P. mirabilis*19株を対象とした。MIC測定はNCCLSの微量液体希釈法により行った。PCR法により19株全株でCTX-M-2型β-ラクタマーゼ遺伝子を検出後、さらに構造遺伝子の塩基配列を決定した。遺伝子型別は、染色体DNA封入ゲルブラグを*Sma*Iで消化後、得られた消化DNAのバイアス正弦電場ゲル電気泳動像に基づいて行った。

【結果及び考察】*P. mirabilis*19株全株はCTX, CTRX, CPDX, AZT耐生で、CAZには感受性を示した。さらにCTXのMICはクラバン酸の存在下で低下した。構造遺伝子の塩基配列はCTX-M-2型と100%の相同性を示した。遺伝子型別の結果19株中18株については同一(13株)又はこれと極めて類似した(5株)*Sma*I消化パターンを示したが、他の1株のパターンはそれらとは異なっていた。このことから遺伝的に関連性の高い18株と、これらと遺伝的には異なるが共通する薬剤耐性遺伝子を保有する1株に起因する院内感染が特定の病棟に発生していたことが示唆される。なお患者の臨床背景として、その多くの症例で本菌検出前一ヶ月以内にCEZ, CPZ-SBT, LVFXが高頻度に投与されており、基礎疾患としては泌尿生殖器系悪性腫瘍が13例を占めていた。また多くの患者に留置カテーテル処置が施されていた。追跡可能症例12例のうち4例についてはST, FMOX, LVFX, CPZ-SBT, CAZ等の併用投与で除菌が達成されたが、残りの8例では同薬剤やIPMによる治療でも除菌は困難であった。このことから本菌は低MIC値を示す薬剤によっても除菌が困難であったことに加え、患者が入退院を繰り返した結果として院内感染が拡大化した可能性も考えられる。ESBLs産生株による院内流行の報告はまれであり、本報はCTX-M-2型β-ラクタマーゼ産生株に起因する感染症が限定された病棟内に蔓延した事例として注目されるが、院内感染対策により最終的に制御に成功した。本報の詳細についてはJournal of Clinical Microbiology, vol. 42に掲載の予定である。

平成15年度厚生労働科学研究

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）

班会議 日 時：2004年1月13日（火）13：00 P.M.

場 所：東京都新宿区戸山一丁目23番1号

国立感染症研究所 共用第2会議室

演 題	氏 名
1. AmpC大量産生株中のESBL検出方法の確立に関する検討	山口恵三
2. 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	堀田国元
3. 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 <i>gyrA</i> 変異のスクリーニング法の検討	渡邊治雄
4. サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学	山本友子
5. 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	後藤直正
6. <i>Staphylococcus aureus</i> における penicillin-binding protein の分布	和田昭仁
7. 呼吸器感染症からの検査材料を用いた直接 PCR による原因菌の迅速検索法の確立	生方公子
8. セフェム系薬耐性に関わる遺伝子の迅速診断法の確立	井上松久
9. カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究：ダンシル基とチオール基をもつ蛍光剤によるメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の検出	後藤正文
10. 臨床分離病原菌における薬剤耐性の分子機構ならびに遺伝子型別に関する研究	荒川宜親
11. VanD 型バンコマイシン耐性 <i>Enterococcus raffinosus</i>	池 康嘉

AmpC 大量産生株中の ESBL 検出方法の確立に関する検討

山口恵三、Alba Jimena、石井良和

東邦大学医学部微生物学講座

β -ラクタマーゼに安定な第三世代および第四世代セフェム系抗菌薬をも分解する基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(Extended-spectrum beta-lactamase)、いわゆる ESBL を産生株が欧米では院内感染の原因菌として注目されている。本邦でも、本酵素を産生する菌株の分離頻度が *Escherichia coli* や *Klebsiella pneumoniae* を中心に増加の傾向を示している。National committee of Clinical Laboratory Standard (NCCLS) は、*E. coli*、*K. pneumoniae* および *K. oxytoca* の ESBL 産生株のスクリーニング方法と確認方法を公表している。しかし、ESBL はこれら 3 菌種のみが産生するのではなく、その他のグラム陰性菌も産生する可能性を有している。事実、イタリアなどで実施されたサーベイランスでは、多くの腸内細菌科に属する菌種に ESBL が確認されており、わが国でも NCCLS が推奨する方法に規定されている菌種以外にも ESBL を産生する菌種が存在すると思われる。彼らのサーベイランスはレトロスペクティブに行われており、PCR 法により ESBL の遺伝子が確認されていた。しかし、臨床検査の現場においてこのような方法を実施することは困難であり、薬剤感受性試験の結果から直接、あるいはその変法を実施することにより判定できるのが理想である。今回私たちは、ディスク法の変法である、3次元拡散法を応用して AmpC 大量産生株が同時に産生する ESBL の検出法の確立を試みた。

Enterobacter cloacae NUH10 (AmpC 大量産生株)、*E. cloacae* P99 (AmpC 大量産生株)、ESBL 産生株として *E. coli* (Toho-1 産生株)、*K. pneumoniae* (SHV-26 産生株)、*Pseudomonas aeruginosa* (IMP-1 産生株)、*E. coli* (KPC-3 産生)、*E. coli* (TEM-1) 産生株、*Proteus mirabilis* (CTX-M-14 産生株) を供試菌株とした。培地はミューラーヒントン寒天培地 (日本ベクトン、東京)、薬剤感受性用ディスクとしてセフォタキシム、セフトジジム、セフェピム、イミペネム (日本ベクトン、東京) を、寒天培地上に塗布する感性株として *E. coli* ATCC25922 を使用した。3次元拡散法は、K. S. Thomson が報告した方法に準じて実施した。

E. cloacae NUH10 および *E. cloacae* P99 といった AmpC 大量産生株は、AmpC のセフェピムに対する分解する効率が悪いことから阻止円の縮小が認められなかった。一方、ESBL のセフェピムの分解効率がよいことから、阻止円の顕著な縮小を認めた。これらのことからセフェピムを用いて 3次元拡散法を行えば、AmpC 大量産生株が同時に ESBL を産生している場合でも、感度よく検出できるものと思われた。現在、多種類の酵素を使用して本方法の有用性の確認を進めている。また、IMP-1 産生株ではイミペネムおよびセフトジジムの阻止円の縮小が認められた。この方法を利用すれば、OprD の減少あるいは欠損によるイミペネム耐性と IMP-1 産生による耐性を区別することが可能となるものと考えられた。

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 国立感染症研究所生物活性物質部 堀田国元

協力研究者 国立感染症研究所生物活性物質部 石野敬子

1. MRSA におけるアミノグリコシド耐性

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ることなどを見出した。このような状況に変動が見られるかどうかについて本年度分離された菌株を対象にモニタリングしている。

ABK 耐性菌として分離された 100 株について AG 耐性、AG 修飾酵素遺伝子プロファイル、および *coa* *AluI* RFLP を調べ、以下の結果を得た。

AG 耐性と AG 修飾酵素遺伝子プロファイルの相関性を調べた結果、ABK にも GM にも感受性で二機能酵素遺伝子も含まれていない菌株がかなりの頻度で含まれていた。耐性の判定精度を高めるためには PCR による遺伝子のチェックが不可欠と判断された。一方、コアグララーゼ型の分布には顕著な変動は認められず、型別の遺伝子プロファイルも同様と判断された(表 1 参照)。

表 1. コアグララーゼ遺伝子型別 AG 修飾酵素遺伝子のプロファイル

<i>coa</i> 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			
	443株	ac6'/ph2"	aad4'	aph3'	100株	ac6'/ph2"	aad4'	aph3'
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

2. 緑膿菌におけるアミノグリコシド耐性

緑膿菌においては MRSA よりも多様なアミノグリコシド耐性プロファイルが知られており、各種の AG 修飾酵素遺伝子が関与している。それらの遺伝子を特定するとともに迅速簡便な遺伝子モニタリングの方法の確立に向けての結果についても報告する。