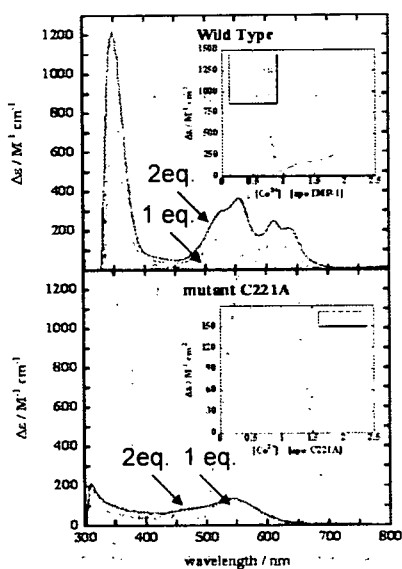
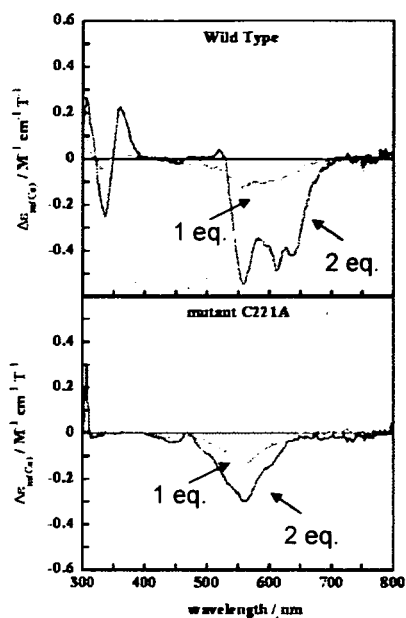


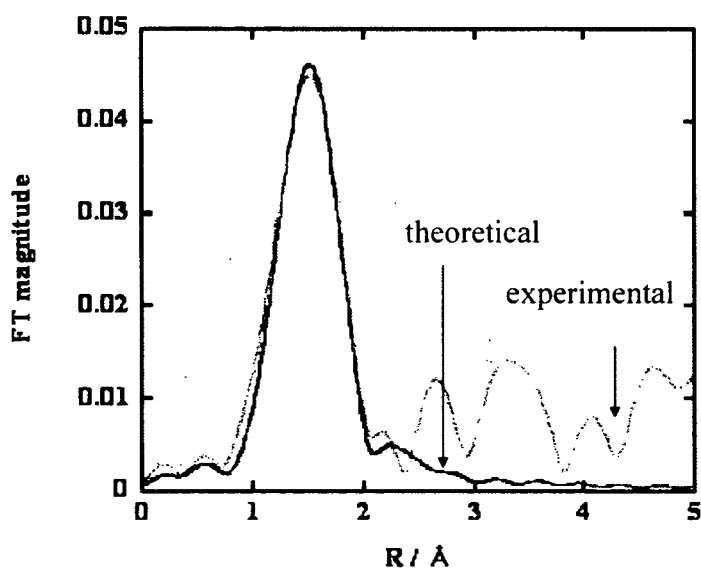
**Figure 1.** The overall structure (left) and the active site (right) of CcrA (PDB code:1ZNB).



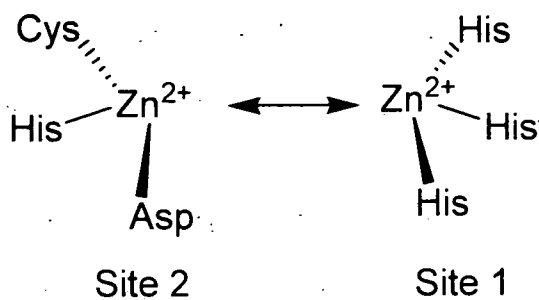
**Figure 2.** Spectrophotometric titration of apoIMP-1 (top) and mutant C221A (bottom) with  $\text{Co}^{2+}$ . Absorption spectra of 633 mM apoIMP-1 or 437 mM mutant C221A in 50 mM MOPS-NaOH, 1.0 M NaCl, 30% glycerol, pH7.0, plus successive 0.2 eq. of  $\text{Co}^{2+}$ . Each spectrum is subtracted from that of apo WT IMP-1 or mutant C221A in the absence of  $\text{Co}^{2+}$ . Inset: Plot of absorbance against equivalents of  $\text{Co}^{2+}$  at given wavelengths.



**Figure 3.** MCD spectral changes of apoIMP-1 (top) and mutant C221A (bottom) with  $\text{Co}^{2+}$ . Absorption spectra of 510 mM apoIMP-1 or 650 mM mutant C221A in 50 mM MOPS-NaOH, 1.0 M NaCl, 30% glycerol, pH7.0.



**Figure 4.** The Fourier-transformed data (over a  $k$  range of 2.0–10.6  $\text{\AA}^{-1}$ ) of mono IMP-1.



**Figure 5.** Proposed coordination mode of the active site in the mono- $\text{Zn}^{2+}$ -IMP-1 enzyme.

**Table 1.** The coordination numbers of nitrogen (or oxygen) and sulfur atom(s) ( $N$ ), average distance ( $r$ ) and Debye-Waller factor ( $\sigma^2$ ) are shown. These parameters are obtained from the EXAFS data by the fitting procedure over the  $r$ -range 2.0-10.6 Å.

shell	$N$	$r$ (Å)	$\sigma^2$ (Å <sup>2</sup> )
Zn-N	3.0	2.02	0.0092
Zn-S	0.3	2.71	0.0186

$S_0^2 = 1.1$ ,  $\Delta E_0 = 4.5$  eV, where  $S_0^2$  is the amplitude reduction factor and  $\Delta E_0$  is the energy shift (39). The coordination numbers were also fixed for the curve-fitting procedure. \*The residue of the fit was 8.4, which is calculated from:

$$R(\%) = \frac{\sum |\phi_{\text{exp}} - \phi_{\text{theo}}|}{\sum |\phi_{\text{exp}}|} \times 100.$$

薬剤耐性菌等に関する研究班  
多剤耐性緑膿菌(multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP)  
の出現メカニズムに関する研究

分担研究者 後藤直正 京都薬科大学薬学部 微生物・感染制御学分野

研究要旨

昨年度の研究では、多剤耐性緑膿菌(MDRP)を含む緑膿菌臨床分離株 227 株のハウスキーピング遺伝子群および変異修復遺伝子群(*mutL*, *mutS*, *uvrD*, *mutT*, *mutY*, *recA*)の計 12 遺伝子の塩基配列を情報をもとに Multilocus sequence typing (MLST)による分子系統解析を行い、緑膿菌には少なくとも 4 つの MDRP クラスターが存在することを明らかにした。本年度研究では、MLST 解析に用いた緑膿菌臨床分離株での抗菌薬耐性メカニズムを調べた。その結果、MDRP のクラスター間で耐性メカニズムが異なることが明らかとなった。これは、MDRP の発生機構が系統的に異なることを示している。

研究協力者:

久徳恵美、皆川周(京都薬科大学薬学部 微生物・感染制御学分野); 石井良和、山口恵三(東邦大学医学部 微生物・感染症学講座)

A. 研究目的

多剤耐性緑膿菌(multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP)による薬剤耐性緑膿菌感染症(感染症法第5類定点把握疾患)の増加とアウトブレイクが臨床で問題となっている。本耐性菌の問題点は抗緑膿菌活性の高い抗菌薬のほとんどに耐性を示すことから、抗菌薬治療が極めて困難なことにある。このような MDRP の出現抑制には、出現メカニズムを明らかにすることが必要である。

緑膿菌における抗菌薬耐性について次のようなメカニズムが明らかにされている。カルバペネム耐性は外膜孔形成タンパク質 OprD の欠損とβ-ラクタマーゼ(おもに Bla<sub>IMP</sub>, Bla<sub>VIM</sub>)の産生、キノロン耐性は DNA ジャイレース・A サブユニット(GyrA)と DNA トポイソメラーゼ・A サブユニット(ParC)の変異によるキノロン親和性の低下および Mex 排出システムの発現亢進、そしてアミノグリコシド耐性は修飾酵素の産生による。これらの耐性メカニズムのうち、OprD の欠損、GyrA と ParC の変異や Mex 排出システムの発現亢進は緑膿菌染色体にコードされた遺伝子の変異

によるものであり、β-ラクタマーゼ(おもに Bla<sub>IMP</sub>, Bla<sub>VIM</sub>)の産生はプラスミド性である。

本研究の目的は、Multilocus sequence typing (MLST) によって見出した MDRP の系統間での耐性メカニズムの相異を明らかにし、出現防止策の考案のための情報基盤を構築することである。

B. 研究方法

1. 使用菌株: 日本各地の医療施設から分与された臨床分離緑膿菌 226 株(MDRP 91 株, non-MDRP 135 株)と実験室株 PA01 の計 227 株
2. OprD の検出: 精製した OprD を抗原として作成した抗 OprD 特異抗体によるウェスタン・イムノブロットにより検出した。
3. β-ラクタマーゼ(おもに Bla<sub>IMP</sub>, Bla<sub>VIM</sub>)の産生: すでに報告されたプライマーを用いた PCR により遺伝子の存在を調べた。
4. DNA ジャイレース・A サブユニット(GyrA)と DNA トポイソメラーゼ・A サブユニット(ParC)の変異: これらをコードする遺伝子内のキノロン耐性決定領域(QRDR)の塩基配列をキノロンに感受性を示す実験室株 PA01 のそれらの塩基配列と比較することにより、遺伝子型を決定した。
5. Mex 排出システムの発現検出: Mex 排出システムのインヒビターとキノロン系薬であるレボフロキサシ

ンとの併用効果の有無を、考案したディスク法により調べることによって Mex 排出システムの発現亢進を解析した。

6. アミノグリコシド耐性は修飾酵素の検出: PCR 法により遺伝子の存在を検出した。

### C. 研究結果

耐性メカニズムの検出結果と MLST 系統樹との相関解析(Fig. 1)から次のことが明らかとなった。

- 1) MDRP の 86%で OprD が欠損していたが、クラスターでの分布の偏りは見られなかった。
- 2) カルバペネム耐性臨床分離株では、OprD の欠損と Bla<sub>IMP</sub> や Bla<sub>VIM</sub> などの β-ラクタマーゼとが同時に起こった株が多く検出された。
- 3) Mex 排出システムの高発現は C2 や C4 クラスターに特異的であった。
- 4) *gyrA* および *parC* の変異については、C2 や C4 クラスターでは 2 重変異が、一方、C1 や C3 クラスターでは 3 重変異が観察された。
- 5) Mex の発現程度と *gyrA* および *parC* の変異の相関解析を行ったところ、C2 や C4 クラスターでは Mex システムの高発現とキノロン標的遺伝子の 2 重変異が、一方、C1 や C3 クラスターでは Mex システム発現は野生株程度であったが、キノロン標的遺伝子では 3 重変異が明らかとなった。

### D. 考察

以上の結果は、キノロン耐性は Mex 排出システムの発現と *gyrA* および *parC* の変異の相乗的効果によってもたらされているが、キノロン耐性の発生機構は系統的に異なることを示している。

### E. 結論

MDRP クラスターの耐性機構の相異について解析したところ、MDRP では染色体遺伝子の多発が起こっているが、その発生系統は異なることが示唆された。これらのことは、抗菌薬の使用によって発生する MDRP は異なることを示唆するものであり、抗緑膿菌

性抗菌薬の使用にあたっては、MDRP の発生を考慮することが重要であることを示唆している。

来年度の研究では、耐性変異率と MDRP クラスターとの関連を明らかにすることを計画している。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. (原著論文) Masaru Ohara, Shuntaro Kouda, Makoto Onodera, Yoshihiro Fujiue, Megumi Sasaki, Tadahiro Kohara, Seiya Kashiya, Shizue Hayashida, Manami Kadono, Hitoshi Komatsuzawa, Naomasa Gotoh, Tuguru Usui, Hideyuki Itaha, Masao Kuwabara, Takashi Yokoyama, and Motoyuki Sugai: Molecular characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hiroshima, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 51, 271-277 (2007).
2. (原著論文) Ken Eguchi, Yutaka Ueda, Katsunori Kanazawa, Makoto Sunagawa, and Naomasa Gotoh: The mode of action of 2-(thiazol-2-ylthio)-1b-methylcarbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*: the impact of outer membrane permeability and the contribution of MexAB-OprM efflux system. *J. Antibiot.*, 60, 129-135 (2007).

#### 2. 学会発表

1. 小川倫洋、野口薫、山下敦士、石井良和、山口恵三、服部正平、後藤直正: Multi-locus sequence typing (MLST)法による多剤耐性緑膿菌(MDRP)の分子系統解析. 第1回日本ゲノム微生物学会(木更津), 2007. 3.
2. 野口薫、小川倫洋、石井良和、山口恵三、後藤直正: Multi-locus sequence typing (MLST)による多剤耐性緑膿菌(MDRP)の分子系統解析. 第80回日本細菌学会総会(大阪), 2007. 3.
3. 久徳恵美、中尾希実子、米田真俊、皆川周、後藤直正: 緑膿菌臨床分離株における抗菌薬耐性化機構の解析. 第60回日本細菌学会関西支

部総会 (大阪), 2007. 11.

4. 久徳恵美、皆川 周、後藤直正: MLST 分子系統解析によって明らかにした多剤耐性緑膿菌 (MDRP) クラスター間での抗菌薬耐性機構の相異. 第 81 回日本細菌学会総会 (京都), 2008. 3.

5. 久徳恵美、中尾希実子、米田真俊、皆川周、後藤直正: 多剤耐性緑膿菌 (MDRP) MLST 系統クラスター間での抗菌薬耐性機構の相異. 日本薬学会第 128 年会 (横浜), 2008.3.

### 3. 参考資料

1. 野口薫, 後藤直正: 新世紀の感染症学 上 - 新時代の基礎・臨床研究. 感染症学総論 VII. 抗菌薬. 3. 多剤耐性化と対策 1) 薬剤耐性化 i. 緑膿菌の多剤耐性化の機序. *日本臨牀*, 65 増刊 2, 457-462 (2007).

2. 野口薫, 後藤直正: 特集. 多剤耐性緑膿菌感染症. 2. 緑膿菌における薬剤耐性の分子機構. *化学療法の領域*, 23, 29-34 (2007).

3. 後藤直正: 耐性菌感染症の現状と対策: MDRP および MDRP 感染症-基礎. MDRP 発生のメカニズム. *医学のあゆみ*, 211, 511-515 (2007).

4. 後藤直正: 多剤耐性緑膿菌の耐性メカニズム. *呼吸器科*, 12, 89-94 (2007).

### H. 知的所有権の出願・登録状況

#### 1. 特許出願

なし

#### 2. 実用新案登録、その他

なし

# MLST分子系統樹

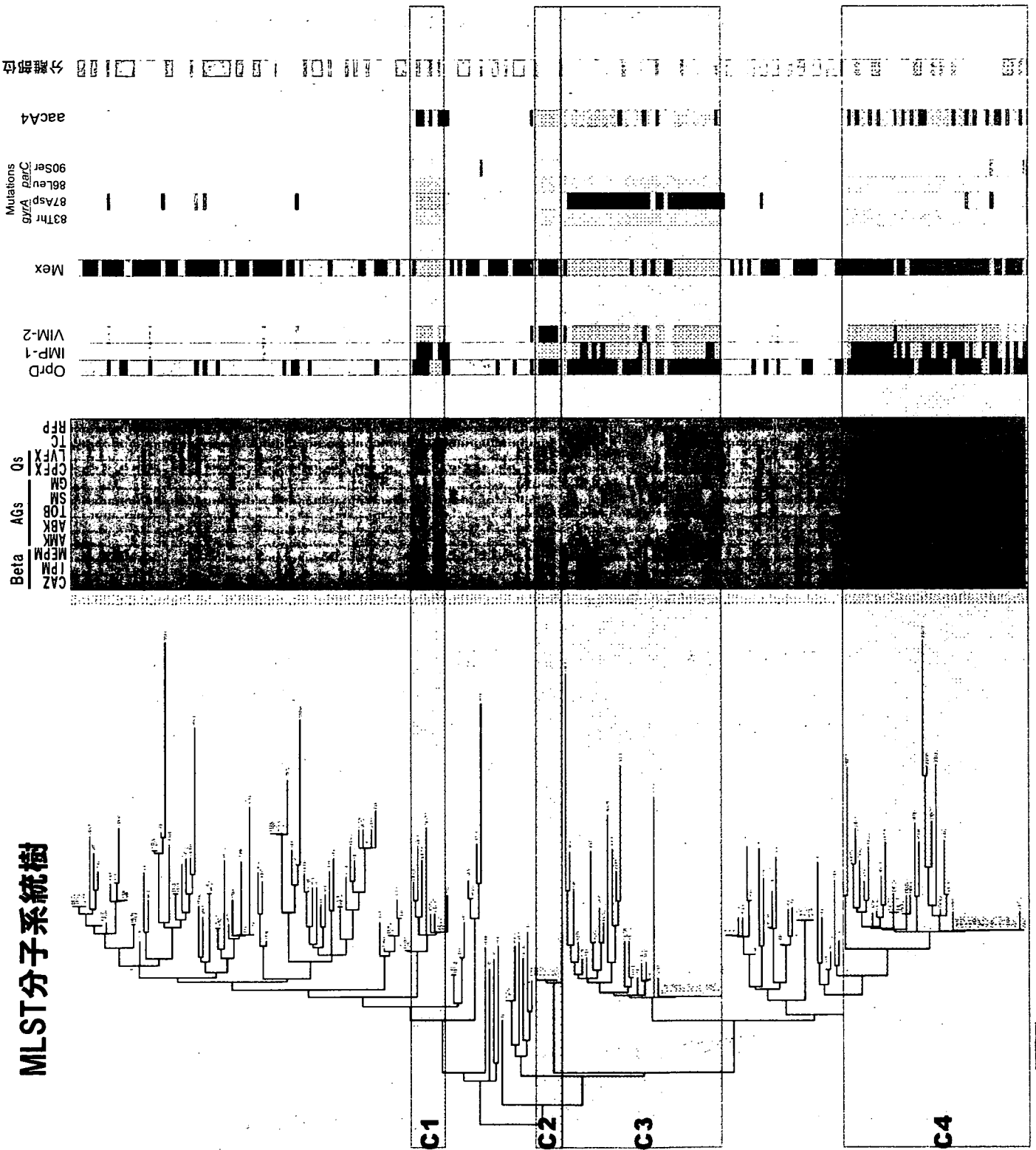


Fig. 1 緑膿菌臨床分離株のMLST分子系統樹と抗菌薬耐性メカニズム

分離部位

呼吸器  
皮膚

Mutations

*gyrA* *parC*

83Thr 87Asp 86Leu 90Ser

87A 87C 87D

A3840 A3840

C8381 C8381

クラス D に属する  $\beta$ -ラクタマーゼの検出法確立に関する基礎的検討

分担研究者: 山口 恵三 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

研究要旨

クラス D に属するカルバペネマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* が院内感染の原因菌の一つとして、日本を除くアジア諸国や欧米で大きな社会問題となっている。クラス D に属する  $\beta$ ラクタマーゼはアミノ酸レベルの相同性が 20%未満のものを含む大酵素群である。昨年は、特異的阻害剤を利用した検出法の確立を試みたが、菌体内移行性が悪いことなどの理由から検出法の確立には至らなかった。そこで、本年度は、酵素の大量産生系を構築して来年度以降の検出系の確立に供することにした。通常の方法により、OXA-23 を除くクラス D に属する  $\beta$ ラクタマーゼの大量発現系を構築することはできなかった。OXA-23 を除く酵素はシグナルペプチドを削除して細胞質内に発現させることにより、酵素の大量取得が可能になると考えられた。

研究協力者: 石井良和、嵯峨知生、  
神山裕一  
東邦大学医学部微生物・感染症学講座

A. 研究目的

$\beta$ ラクタマーゼは、グラム陰性菌の  $\beta$ ラクタム系抗菌薬に対する主要な耐性メカニズムである。 $\beta$ ラクタマーゼは Ambler によって 4 クラスに分類されている。クラス A、クラス C およびクラス D に属する酵素は活性中心にセリン残基を有するセリンペプチダーゼである。一方、クラス B に属する酵素はその活性に亜鉛を要求するメタロエンザイムである。クラス A に属する酵素は、クラブラン酸などの  $\beta$ ラクタマーゼ

阻害剤により、クラス C に属する  $\beta$ ラクタマーゼはボロン酸により、さらにクラス B に属する  $\beta$ ラクタマーゼはキレート剤により阻害を受ける。したがって、クラス A、クラス B およびクラス C に属する  $\beta$ ラクタマーゼ産生菌は、各クラス特異的阻害剤を用いて簡便に検出することが可能であり、既に実用化されている。しかし、特異的阻害剤が存在しないなどの理由から、OXA 型  $\beta$ ラクタマーゼはその検出法が確立されていない。欧米や中国、韓国等の諸外国では、多剤耐性のクラス D に属するカルバペネマーゼ産生アシネトバクターによる感染症が大きな社会問題となっており、院内感染も多発しているとの情報がある。そのような背景か

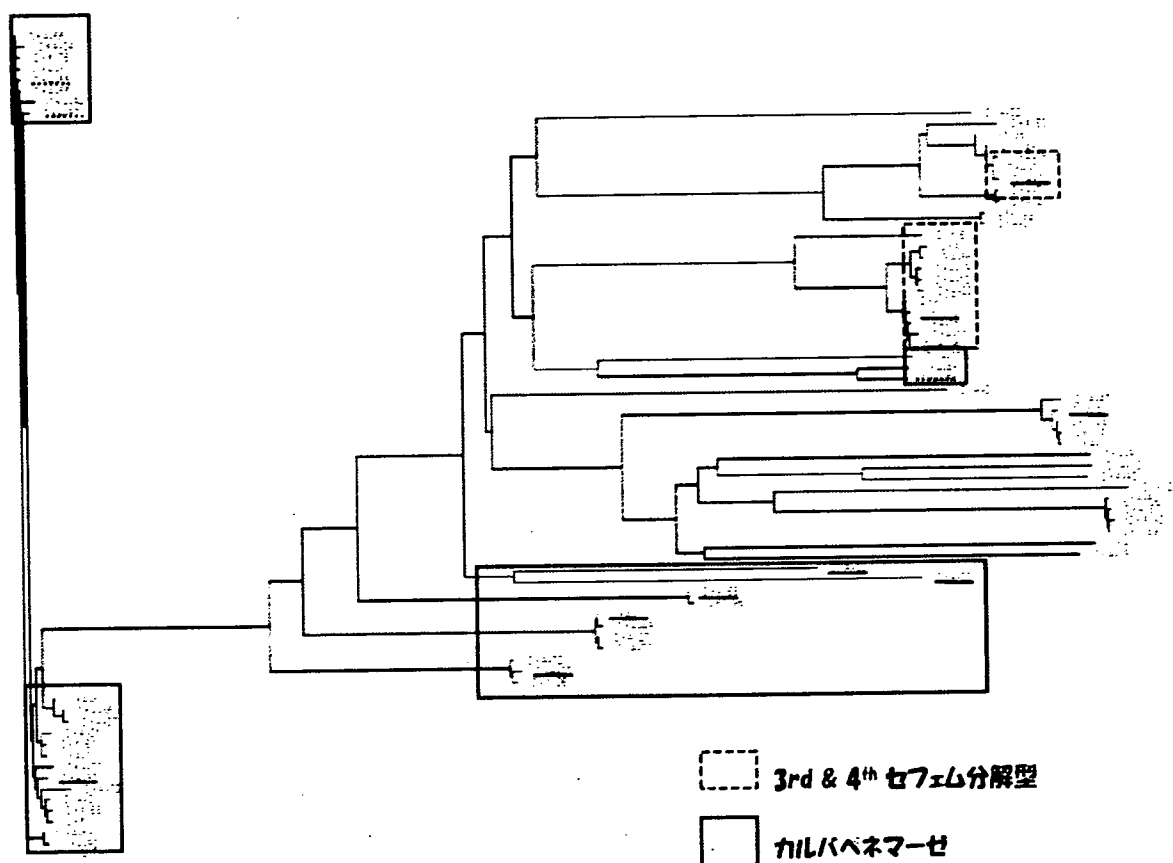


ら、本邦ではあまり問題となっていないが、クラス D に属するカルバペネマーゼの臨床的重要性を考えると、本酵素産生株の検出法を確立することは急務であると考えられる。昨年度はクラス D  $\beta$ ラクタマーゼに対する特異的阻害剤を用いた検出系の確立を試みたが、阻害剤の菌体内への取り込み効率が低く、またクラス D の中でも阻害されない酵素があることなどの理由から、検出法を構築することができ

## B. 研究方法

OXA 型  $\beta$ ラクタマーゼのアミノ酸配列を基に系統樹作成したところ、相同性が低い 12 グループからなる大きな酵素群であることが明らかとなった(図 1)。この中で、カルバペネム系薬分解能を有する酵素は、4 つの異なるグループを形成していることが判明した。また、これら 4 つのグループの中に欧米で問題となっているクラス D に属するカルバペネマーゼで

図1. クラスDに属する $\beta$ ラクタマーゼ全体の系統樹



なかった。そこで、本年度から来年度は、クラス D に属するカルバペネマーゼの代表酵素を選択し、それらに対する検出系の確立を目的として研究を実施する。

ある、OXA-23、OXA-40、OXA-51 および OXA-58 がそれぞれ含まれていた。そこで、カルバペネム系薬分解能を有する OXA-23、OXA-40、OXA-58 および OXA-69 (OXA-51 のグループに属する) の酵素を精製することした。

具体的には、これらのβラクタマーゼをコードする遺伝子をPCRクローニングし、その大量発現系の構築を試みた。大量発現系は、pET28aを用いて構築した。

### C. 研究結果

OXA-23は、pET28aベクターのマルチクローニングサイトにその構造遺伝子を挿入し、野性型酵素を大量精製することに成功した(表1)。しかし、それ以外の3種類の酵素はこの方法で精製酵素を得ることができなかった。OXA-23を含む全ての酵素の既に報告されている精製条件ではカラムに酵素を吸着させることができず、全ての条件を再検討しなければならなかった。さらに、酸性条件下では、いずれの酵素の安定性も失われ、精製前の透析などの操作で沈澱が生じてしまい、酵素活性持認められなくなった。これらの酵素のC-末端にHis-tagを付加して精製することを試みた。しかし、定法に従ってIPTGで酵素産生を誘導したが、酵素産生量が少ないなどの理由から、必要・十分量のβラクタマーゼを得ることができなかった。そこで、各酵素のシグナルペプチドを削除した上で、C-末端にHis-tagを付加したβラクタマーゼの発現系の確立を試みた。その結果、OXA-69を除く酵素の強い

発現が確認された(表1)。

### D. 考察

私どもは、2006年から2007年に東邦大学医療センター大森病院で分離された51株の*Acinetobacter baumannii*を用いてOXA-23およびOXA-51をコードする遺伝子の保有状況を確認した。その結果、51株中10株にOXA-23をコードする遺伝子の保有が確認された。幸運にもこれらの菌株は、OXA-23を発現していなかったが、この中のいくつかの菌株はOXA-23の発現と関与するISAba1を保有していた(未発表)。この結果は、欧米からのOXA-23産生*A. baumannii*に関する発表を考えあわせると、本邦でもOXA-23産生*A. baumannii*が出現する可能性を強く示唆している。したがって、OXA型カルバペネマーゼ*A. baumannii*のモニタリングは急務であると考えられる。そのような背景からもOXA型カルバペネマーゼ産生菌株の検出方法を早急に確立することが必要であると思われる。

本年度は、様々な方法でOXA型酵素の大量産生系の構築を試み、最終的にはシグナルペプチドを削除して細胞質内で発現させる方法で代表酵素の標品を取得する目処が立つに至った。今後、培養および誘導条件を最

表1. クラスD型カルバペネマーゼ大量発現系構築の進捗状況

進捗状況	酵素名			
	OXA-23	OXA-40	OXA-58	OXA-69
クローニング	済	済	済	済
Native大量産生系	済	済	済	済
His-tag付	済	済	済	済
His-tag付・N-末削除	済	済	済	済
発現確認	済	済	済	未

適化し、全ての代表酵素の大量発現およびその精製を試み、得られた標品を来年度の研究に供する予定である。

#### E. 結論

クラス D に属する  $\beta$  ラクタマーゼの大量産生系の確立を試みた。培養・酵素の誘導条件の最適化が必要であるが、シグナルペプチドを削除して細胞質内で発現させる方法による発現系の確立の目処を立てることができた。クラス D に属するカルバペネマーゼの検出法の確立に大きく近づいた。

#### F. 健康危険情報

我が国においてクラス D に属するカルバペネマーゼの存在は未だ確認されていない。しかし、本年度の予備的検討から、臨床材料から分離される *A. baumannii* の約 20% の菌株が OXA-23 をコードする遺伝子を保有していることが明らかとなった。OXA-23 はメタロ  $\beta$  ラクタマーゼと同様、臨床上重用されているカルバペネム系薬を含む多くの  $\beta$  ラクタム薬を分解する能力を有する。OXA-23 を産生する *A. baumannii* が増加し、化学療法の際に大きな障害となる事が強く懸念される。したがって、今後も OXA-23 をコードする遺伝子保有株の動向を監視することが必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ishii Y, Tateda K, Yamaguchi K; the JARS. Evaluation of antimicrobial susceptibility for  $\beta$ -lactams using the Etest method against clinical isolates from 100 medical centers in Japan (2006). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 177-183.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録、その他

なし

薬剤耐性菌等に関する研究班

肺炎球菌におけるマクロライド耐性機構の解析

分担研究者 山本 友子 千葉大学大学院薬学研究院 微生物薬品化学講座

## 研究要旨

テリスロマイシン(TEL)はマクロライド高度耐性菌にも有効なケトライド系抗菌薬で、マクロライド耐性肺炎球菌性肺炎の治療に使用されてきたが、既に欧米では TEL 高度耐性肺炎球菌が分離・報告されている。わが国においても、耐性菌の出現と増加が懸念されていることから、国内の肺炎球菌のケトライド耐性化の現況を明らかにし、ケトライド耐性機構とマクロライド高度耐性機構を検討した。昨年度に引き続き、2005 年に国内の医療機関で分離された肺炎球菌 103 株についてマクロライド・ケトライド耐性を調査した結果、67%がマクロライド耐性を示し、その中の 35%が高度耐性菌であった。TEL 耐性菌は含まれていなかった。人為的に選択した TEL 耐性株の解析により、23S rRNA の変異と riboprotein L22 の変異の蓄積により TEL に高度耐性化することが明らかとなった。マクロライド不活化酵素遺伝子 *ereA/B*, *mphA* は、黄色ブドウ球菌をはじめ多くの菌種で報告されているが、現在のところ肺炎球菌には見出されていない。そこで、臨床分離肺炎球菌 257 株を対象に *Mycrococcus luteus* を指示菌とした Bioassay 法を用いて、マクロライド不活化型耐性菌の検索を行なったところ候補 1 株が見出された。

## 研究協力者：

高屋明子（千葉大学大学院薬学研究院・微生物薬品化学研究室）和田昭仁（国立感染症研究所・細菌第一部）遠藤菊太郎（北海道薬科大学・生命科学分野）岡崎充宏（杏林大学病院・中央検査部）

### A. 研究目的

肺炎球菌は呼吸器感染症の主要な起因菌であるが、近年多剤耐性化が進行し、なかでも繁用されるマクロライド系抗菌薬に対する高度耐性化が深刻な問題となっている。Telithromycin(TEL)はマクロライド高度耐性菌にも有効なケトライド系抗菌薬で、マクロライド耐性肺炎球菌性肺炎の治療に使用されてきたが、既に欧米では TEL 低感受性肺炎球菌の増加と高度耐性菌が報告されている。わが国においても、耐性菌の出現と増加が懸念されることから、それを防止する為に調査と監視を継続しつつ、さらに実効ある対策を講じる

事が急務となっている。本研究では、昨年度に引き続き、肺炎球菌のケトライド耐性化の現況を明らかにし、耐性機構の解明をめざす。さらに、人為的に選択した TEL 耐性株を用いてその耐性機構を解析することにより、TEL 耐性を獲得する機構を明らかにする。又、本研究において分離された 257 株の Erythromycin(EM)高度耐性菌について、新型の耐性機構の存在を検討する。

### B. 研究方法

1. MIC (最小発育阻止濃度)については CLSI 法に準じて測定した。培地は血液寒天培地（ミューラーヒントン寒天培地+5%馬脱繊維血）を用い、37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

2. 薬剤：TEL は、ケテック錠（サノフィ・アベンティス）から抽出後、再結晶化した。構造は C-13NMR により確認し、力価は、ATCC29213 株を用いて MIC 測定とディスク拡散法によって評

価した。その他の薬剤は市販のものを用いた。

3. EM 不活化型耐性菌の検索：耐性菌を EM 含有培地で一晚培養した後、薬剤の残存活性を *Mycrococcus luteus* を指示菌とした Bioassay により測定した。

4. PCR, DNA 塩基配列決定は定法に従った。

### C. 研究結果

1) 2005 年度に国内の医療機関で新たに分離された肺炎球菌 103 株について耐性調査(表 1)と耐性遺伝子 *ermA/B*、*mefA/E* の保有状況を検討した(図 1)。MIC(EM) 8 $\mu$ g/ml 以上の耐性菌は 67 株(65%)、128 $\mu$ g/ml 以上の高度耐性菌は 36 株(35%)存在した。外来性の耐性遺伝子保有率は *erm* (47%)、*mefA/E* (30%)、*erm +mefA/E* (8.7%)であった。TEL 低感受性株/耐性株は 0%であった。昨年度実施した他の医療機関由来の肺炎球菌 154 株中には MIC(EM) 128 $\mu$ g/ml 以上の高度耐性菌が 34 株(22%)、TEL 低感受性株 (1 $\mu$ g/ml) が 3 株存在した。肺炎球菌のマクロライド高度耐性化は急速に進行しているが、欧米に見られるような TEL 耐性化は進んでいないといえる。

$\mu$ g/ml	TEL $\mu$ g/ml	EM	CAM	AZM	RKM	CLDM	MKM-B
0.003	0.0	0.03	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.0063	28.2	0.063	15.5	14.6	10.7	10.7	0.0
0.0125	60.2	0.125	20.4	25.2	13.6	37.9	46.6
0.025	77.7	0.25	25.2	32.0	17.5	51.5	46.6
0.05	86.4	0.5	28.2	35.9	21.4	52.4	47.6
0.1	90.3	1	35.0	47.6	24.3	57.3	47.6
0.2	95.1	2	43.7	52.4	30.1	68.9	47.6
0.4	100.0	4	46.6	57.3	37.9	72.8	47.6
0.8	100.0	8	50.5	61.2	46.6	74.8	50.5
1.6	100.0	16	59.2	67.0	48.5	85.4	57.3
3.2	100.0	32	59.2	67.0	48.5	85.4	57.3
6.4	100.0	64	65.0	71.8	49.5	91.5	67.0
12.8	100.0	128	70.9	71.8	57.3	95.1	80.6
		256	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

MIC50

MIC90

表 1 2005 年臨床分離肺炎球菌のマクロライド・ケトライド耐性

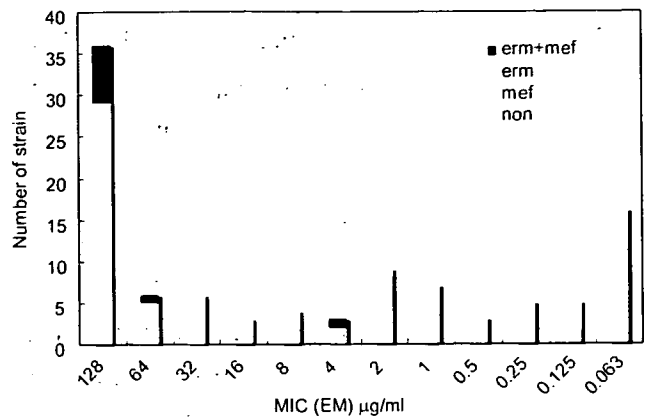


図 1 *erm* および *mef* 遺伝子の分布

2) 1999 年~2003 年に実施された PROKET (Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin) Study [Antimicrob. Agents Chemother. 48:1882 (2004)]において報告された Strain P3084055 は、日本で最初に分離された TEL 耐性 [MIC(TEL) 4 $\mu$ g/ml] 肺炎球菌である。TEL 耐性機構を解明する目的で耐性関連因子を検討した結果、① *ermB* の高発現変異 ② riboproteinL4 の変異 (S20N) が明らかとなった。③肺炎球菌は 4 コピーの rRNA (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*)を有している。すべての対立遺伝子について塩基配列を検討した結果、domain II に変異 domain II に次のような変異が明らかとなった(表 2)。

Mutation/Heterozygosity=A138G/0A:4G,

T389C/1T(*rrnA*):3C, C724T/0C:4T

3) 既存の Erythromycin (EM) 高度耐性菌が TEL 耐性を獲得する機構を明らかにするために、P3084055 (MIC4 $\mu$ g/ml)から、2 x MIC 選択により人為的に TEL 高度耐性株耐性株を得て、23S rRNA の各コピー遺伝子と riboprotein L2、L4 遺伝子の上に現れる変異を解析した。*rrnA* の T389 が C に変異して T389C/0T:4C となった株は TEL 耐性が [MIC(TEL) 32 $\mu$ g/ml] 上昇していた。さらに riboproteinL22 の変異 (K94E) によって TEL 高度耐性 [MIC(TEL) 512 $\mu$ g/ml] となった。この

結果より、23S rRNA の domain II の T389 変異との L22 の変異の蓄積が、肺炎球菌の TEL 高度耐性化をもたらすことがすることが明らかとなった (表 2)。

4) マクロライド不活化酵素遺伝子 *ereA/B*, *mphA* は、黄色ブドウ球菌をはじめ多くの菌種で報告されているが、現在のところ肺炎球菌には見出されていない。そこで、上述の臨床分離肺炎球菌 257 株を対象に PCR 法で既知の *ereA/B*, *mphA* の存在を検討したが陰性であった。さらに *Mycrococcus luteus* を指示菌とした Bioassay 法を用いて、マクロライド不活化型耐性菌の検索を行なったところ候補 1 株が見出された。現在この遺伝子のクローニングを行い、来年度には性状を明らかにする予定である。

Strain	MIC (TEL) $\mu$ g/ml	23S rRNA						
		Domain II				DomainV	L4	L22
		A	B	C	D	A/B/C/D		
P3084055	4	A138G T389T C724T	A138G T389C C724T	A138G T389C C724T	A138G T389C C724T	wild type	S20N	wild type
CS9036	32	A138G T389C C724T	A138G T389C C724T	A138G T389C C724T	A138G T389C C724T	wild type	S20N	Wild type
CS9052	>512	A138G T389C C724T	A138G T389C C724T	A138G T389C C724T	A138G T389C C724T	wild type	S20N	K94E

表 2 Strain P3084055 及び実験室分離 TEL 高度耐性菌

## E. 結論

昨年度に続き他の医療機関にて分離された肺炎球菌のマクロライド・ケトライド耐性化現況を解析した。肺炎球菌のマクロライド耐性化が急速に進行していることが明らかとなった。さらに高度耐性菌の出現も深刻であると考えられる。TEL 耐性菌の分離頻度は、欧米をはじめとする諸外国に比べ低かった。現在まで国内で報告された唯一の TEL 耐性菌 (MIC4 $\mu$ g/ml) P3084055 は、*ermB* を保有していたが、発現量が増大する変異が起きていた。*mefA/E* 陰性であった。肺炎球菌は 4 コピーの rRNA を有していることから、個々の遺伝子につき変異を検討した。その結果、A138G/OA:4G,

T389C/IT(*rrnaA*):3C, C724T/OC:4T の変異が明らかになった。さらに、人為的に選択した TEL 耐性株の解析により、23S rRNA の変異と riboprotein L22 の変異の蓄積により TEL に高度耐性化することが明らかとなった。本研究によりマクロライドのみの使用によってもケトライドに低感受性化、さらにケトライドにより容易に耐性化することが明らかとなったが、今後も出現する事が予想されるため、その動向に注目する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Takaya, A., Wada, A., Kitagawa, N., Hirakata, Y., Yamamoto, T. (2008) Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L22 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by ketolide passage. *in preparation*

## G. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許出願・実用新案登録

なし

1. 高齢者医療施設に見られた *Clostridium perfringens* による集団下痢症の解析
2. ディスク法による肺炎球菌の薬剤感受性測定に影響を与える因子の解析

分担研究者 和田昭仁 国立感染症研究所細菌第一部

1. 高齢者医療施設に見られた *Clostridium perfringens* による集団下痢症の解析

#### 研究要旨

高齢者医療施設の異なる 2 つの病棟で異なる時期に下痢症例数の増加が観測された。下痢症患者から採取した便検体について、*C. perfringens* 由来エンテロトキシン(CPE)を検出した結果、各々の病棟由来検体の 63.2%、41.7%が陽性であった。また、分離された *C. perfringens* の CPE 遺伝子(*cpe*)陽性率は、各々71.4%、68.8%であり、健常人における検出率である 5%と比較し、かなり高率であった。加えて、他の下痢原性細菌は分離されなかったことから、2 つの下痢症例数の増加は CPE 産生性 *C. perfringens* による腸炎集団発生によるものであると判断した。さらに、Pulsed-field gel electrophoresis により、この 2 つの腸炎集団発生が異なる株により引き起こされたことが判明した。また、腸炎集団発生症例及び同期間に発生した孤発性下痢症例から分離された *cpe* 遺伝子陽性株は、共通の 75 kb プラスミド上に *cpe* 遺伝子をもつこと、これらの分離株は *tra* 領域を持つことが判明した。このことから、腸炎集団発生と孤発性下痢症を引き起こした *C. perfringens* では、*cpe* 遺伝子を持つ 75 kb プラスミドが接合により水平伝達している可能性が示唆された。

研究協力者：東京都老人医療センター  
感染症科 稲松孝思

#### A. 研究目的

*Clostridium perfringens* は、偏性嫌気性有芽胞非運動性のグラム陽性桿菌で、ヒトや動物の腸管内に常在する菌であると共に、河川や耕地などの土壤に広く分布する。ヒトの感染症として、ガス壊疽、食中毒、孤発性下痢症が知られている。本菌による下痢症はエンテロトキシン(CPE)産生性 *C.*

*perfringens* が腸管内で芽胞を産生する際に出す CPE により起こる。

この研究では、高齢者医療施設における 2 つの腸炎集団発生と孤発性下痢症の解析を行い、起炎菌となった *C. perfringens* 分離株間での比較を行った。

#### B. 研究方法

下痢症患者から採取した便検体についてグラム染色を行い、両端が丸いグラム陽性桿菌で中央付近に芽胞が観察された検体について、ラテックス逆受身凝集法による CPE

の検出を行った。便検体は等分量のアルコールと混和し室温で 30 分間インキュベーション後、5% egg yolk を含む Gifu Anaerobic Medium agar plate にて嫌気パウチで 35°C、18-24 時間培養を行った。培養後、レシチナーゼ陽性コロニーを選択、溶血活性、非運動性、ガス産生性を示すものについて *C. perfringens* とし、以降の解析に使用した。分離株について PCR 法により *cpe* 遺伝子及び *tra* 領域に存在する *orf16* の検出を行った。分離株のゲノム DNA を制限酵素 *Sma*I, *Not*I で切断後、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による DNA 切断パターンの比較と、*cpe* PCR 産物をプローブとした Southern hybridization を行った。さらに、分離菌のゲノム DNA を制限酵素 *Pvu*II で処理後、通常の電気泳動を行い、*Not*I 75 kb 断片をプローブとした Southern hybridization を行った。

### C. 研究結果

今回、解析の対象とした高齢者医療施設では、通常、毎月 0 から 5 株の *C. perfringens* が検出されている。2006 年 2 月中旬から 4 月初旬にかけて、W10 病棟において下痢症例数の増加が観測され、14 名の下痢症患者から 16 株の *C. perfringens* が分離された。その後 2006 年 4 月中旬には *C. perfringens* の検出数は通常と同じレベルに戻った。しかし、2006 年 7 月後半から 9 月初旬にかけて別の病棟(W08)において、再び下痢症例数の増加が観測され、この病棟の 11 名の下痢症患者から 16 株の *C. perfringens* が分離された。便検体中における CPE の陽性率は、W10 病棟由来検体に

おいて 63.2%、W08 病棟由来検体において 41.7% であった。また分離された *C. perfringens* の *cpe* 遺伝子陽性率は、各々 71.4%、68.8% であった。これらの便検体から、他の下痢原性細菌は分離されなかった。これらのことから、2 つの下痢症例数の増加は、CPE 産生性 *C. perfringens* による腸炎集団発生によるものであると判断した。

2 つの腸炎集団発生の関係を調べるため、W10 病棟由来 18 株(集団発生時の分離株 14 株と他の時期の分離株 4 株)、W08 病棟由来 16 株、及び他病棟で分離された弧発性下痢症由来 5 株について検討を行った。*Sma*I を用い分離株の DNA を切断、PFGE による分離パターンを比較した結果、*cpe* 遺伝子陽性株は 7 パターンに分類された(図 1a)。W08 病棟集団発生由来株と W10 病棟集団発生由来株の PFGE パターンは、各々の病棟内では同一であったが、病棟間では区別可能であったことから(図 1a レーン 1 及び 2、泳動度が異なるバンドを白矢尻で示す)、2 つの集団発生は異なる株により引き起こされたと考えられた。また *Not*I を用い同様に解析した結果、弧発例由来株を含む *cpe* 遺伝子陽性株では 1 株を除いた全ての分離株で 75 kb の DNA 断片が確認されたが、*cpe* 遺伝子陰性株ではこの断片は確認されなかった。図 1 に示した菌株の *Not*I 消化後の PFGE 泳動像を図 1b に示す。さらに、*cpe* 遺伝子の存在部位を確認するため、*cpe* PCR 産物をプローブとした Southern hybridization を行った結果、*Sma*I 処理時では電気泳動開始点にのみシグナルが、*Not*I 処理時ではこの 75 kb 断片との反応が確認された(図 1c)。これらのことから、*Not*I 75 kb 断片はプラスミド由来であること、



また分離株の *cpe* 遺伝子は染色体上ではなく 75 kb プラスミド上に存在することが判明した。分離株が持つ 75 kb プラスミドの相違を比較するため、*PvuII* を用い分離株のゲノム DNA を切断、通常の電気泳動後、*NotI* 75 kb 断片をプローブとした Southern hybridization を行った結果、*cpe* 陽性株では共通する 4 本のバンドが検出されたが、*cpe* 陰性株ではこれと異なるパターンが検出された(図 2)。接合に関する遺伝子が存在する *tra* 領域の *orf16* を PCR 法により検出した結果、*cpe* 遺伝子陽性株は全て陽性であったが、*cpe* 遺伝子陰性株では陰性であった(図 3)。

#### D. 考 察

今回、解析を行った高齢者医療施設では、1993 年にも CPE 産生性 *C. perfringens* による腸炎集団発生事例があり、その終息後は、通常数の *C. perfringens* 検出が続いていた。2006 年、2 つの異なる病棟で異なる時期に下痢症例数の増加が観察された。分離された *C. perfringens* の *cpe* 遺伝子陽性率(W10 病棟 71.4%; W08 病棟 68.8%)は、健常人から分離される *C. perfringens* の *cpe* 遺伝子陽性率(約 5%)と比較しかなり高率であった。また、他の下痢原性細菌は分離されなかった。これらのことにより、2 つの下痢症例数の増加は CPE 産生性 *C. perfringens* による腸炎集団発生によるものであると判断した。

また、集団発生症例及び孤発症例から分離された *cpe* 遺伝子陽性株は、*SmaI* による PFGE パターンが異なるにもかかわらず、共通の 75 kb プラスミドを持つことが判明した。

染色体上に *cpe* 遺伝子が存在する場合は、下流に IS1470 が、一方プラスミド上に *cpe* 遺伝子が存在する場合は、下流に IS1470-like または IS1151 が存在することが知られている。今回分離されたすべての *cpe* 遺伝子陽性株は IS1151 関連 *cpe* 遺伝子を持っていた。これらの株は同時に *tra* 領域を持つことから、IS1151 関連 *cpe* 遺伝子を持つ 75 kb プラスミドが、接合により他の *C. perfringens* へと水平伝達している可能性が示唆された。しかし、その伝達が、いつどこでどのようにおこったかは不明であり、1993 年と 2006 年の腸炎集団発生で分離された株の比較解析が必要であると考えられた。また、より広い実地疫学、分子疫学的な解析も必要であると考えられる。

#### E. 結 論

高齢者医療施設における腸炎集団発生事例が CPE 産生性 *C. perfringens* により引き起こされたこと、分離された *cpe* 遺伝子陽性株は共通の 75 kb プラスミド上に *cpe* 遺伝子を持つことが明らかになった。さらに、分離株が *tra* 領域を持つことから、これらの分離株間でこのプラスミドが接合により水平伝達している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

本研究で示した症例は院内感染であるが、全て軽症であり、自然治癒した。また、食品を媒介とした食中毒集団発生例ではないことから、現時点では医療行政上の重大な問題点であるとは考えられない。

#### G. 研究発表

Epidemiology and Infection submitted

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

なし

### 2. 実用新案登録、その他

なし

## 2. ディスク法による肺炎球菌の薬剤感受性測定に影響を与える因子の解析

### 研究要旨

CLSI のディスク法によるβ-ラクタム剤感受性の判定基準では、測定したい薬剤含有ディスクを使用するのではなく、オキザシリン 1 μg ディスクを使用することが定められている。PSSP10 株、PISP7 株、PRSP3 株をもちい、オキザシリンに加え、セフォタキシム、セフィチゾキシム、セフポドキシム、セフチブテンを含有したディスクが、β-ラクタム剤、特にセファロスポリンに対する感受性の測定に使用できるか否かを調べた。オキザシリンディスクとセフチブテンディスクの阻止円直径は良好な相関が得られ、共に 0 mm, 1-19 mm, ≥20 mm のカテゴリズが可能であったが、他のディスクでは阻止円直径のカテゴリズは困難であった。これらのディスクによるカテゴリズの結果は、セフォタキシムの MIC と相関が見られた。阻止円径 19 mm 以下を示した菌のペニシリン結合たん白 PBP2<sub>x</sub> には、ペニシリン結合ドメインよりも N 末端側に特異的変異が見られた。

### A. 研究目的

肺炎、敗血症、髄膜炎などの重篤な感染症由来の肺炎球菌の薬剤感受性試験では、各種薬剤の MIC 測定を測定することが重要であるが、CLSI が示す微量液体希釈法による測定を、一般の細菌検査室で行うことは困難である。CLSI のディスク法によるβ-ラクタム剤感受性試験の基準では、測定したい薬剤を含むディスクではなく、オキザシリン 1 μg ディスクを使用し、阻止円の直径が 20 mm 以上である場合は、PSSP と判定できるが、19 mm 以下である場合は PRSP, PISP, PSSP のいずれの菌であるかの判定はできないとされている。木村らは、経口セファロスポリンであるセフチブテン

をもちい、GBS のβ-ラクタム剤感受性のスクリーニング法を開発した。本研究では、肺炎球菌のβ-ラクタム剤感受性のスクリーニング法としてセフチブテンならびに他のセファロスポリン含有ディスクをもちいることができるかどうかの検討を行った。

### B. 研究方法

PSSP10 株、PISP7 株、PRSP3 株をもちいた。オキザシリン(1 μg)、セフォタキシム(30 μg)、セフィチゾキシム(30 μg)、セフポドキシム(10 μg)、セフチブテン(30 μg) ディスクをもちい、Muller Hinton Sheep Blood Agar (BD) に McFarland 0.5 号に調整した菌液を塗布し、5% CO<sub>2</sub> 存在下

37°C で 21 時間培養後、阻止円の直径を測定した。CLSI の基準に基づき微量液体希釈法にて測定したペニシリン G とセフトキシムの MIC と阻止円径との関係を調べた。また、ペニシリン結合たん白遺伝子の塩基配列の相違と阻止円径の関連につき検討した。

### C. 結果

5 剤の阻止円直径の相関係数は、オキサシリンとセフチブテン間で 0.985、セフトキシムとセフポドキシム間で 0.919 であったが、他の薬剤間の相関は低かった。オキサシリンならびにセフチブテンディスクによる阻止円径は 20 mm 以上、19 mm 以下、0 mm の 3 群に明確に分けることができた。しかし、PSSP でも 19 mm 以下の阻止円径を示した株が、4 株(40%)、PISP でも阻止円径 20 mm 以上を示した株が 2 株(28.6%)あり、CLSI の基準による PSSP, PISP の判定は困難であるとの結論を得た。一方、オキサシリンディスク及びセフチブテンディスクの阻止円径は、セフトキシムの MIC と良好な相関を示し、0.06 µg/mL 以下の MIC を示した 8 株は全て 20 mm 以上の阻止円径を、0.125 µg/mL 以上の MIC を示した 12 株は全て 19 mm 以下の阻止円径を示した(図 4)。オキサシリンの阻止円径 19 mm 以下を決定する因子としてペニシリン結合たん白遺伝子の配列を調べたところ、PBP2x の 152 番目のアミノ酸が Ala である株は 8 株全てで阻止円径が 20 mm 以上であったのに対し、このアミノ酸が Thr である株 10 株は、阻止円径が 19 mm 以下であった。しかし、2 株はこのアミノ酸が Ala であるにも関わらず、阻止円径は 19 mm 以下

(セフトキシムの MIC は 0.25 µg/mL と 4 µg/mL) であった。

### D. 考察

CLSI はペニシリンに対する感受性を測定する方法としてオキサシリンディスクの使用を規定しているが、このディスクの阻止円径によるカテゴリーはペニシリン G の MIC ではなくセフトキシムの MIC と良好な相関を示した。またセフトキシムの MIC は PBP2x の変異により影響を強く受けるが、PBP2x のペニシリン結合部位の変異(338Thr->Ala, 339Met->Phe)は、オキサシリンディスクないしセフチブテンディスクの阻止円径 19 mm 以下を決定する要因ではなかった。今回研究の対象とした株の PBP2x の配列には、他にも様々なアミノ酸変異が見られたが、阻止円径 19 mm 以下を決定する要因として高い相関を示した変異は 152Ala->Thr であった。しかし、この変異が見られない株でも 19 mm 以下の阻止円径を示した株があったことから、阻止円径を決定するのは単一の因子ではないことが予想された。今後、これらの因子を調べ、本邦分離株におけるディスクによる感受性測定法の有用性の再評価が必要であると考えられる。

### E. 結論

肺炎球菌に対してはオキサシリンディスクとセフチブテンディスクによる感受性測定の有効性は同等であった。これらのディスクによる阻止円径 19 mm 以下は、セフトキシムの MIC 0.125 µg/mL 以上に相当し、PBP2x のペニシリン結合部位以外の変異を原因としている。

#### **F. 健康危険情報**

本研究で示した結果は、感受性測定法の再評価であり、医療行政上の重大な問題点であるとは考えられない。

#### **G. 研究発表**

なし

#### **H. 知的所有権の出願・登録状況**

##### **1. 特許出願**

なし

##### **2. 実用新案登録、その他**

なし