

- ・時間が足りず、もっと時間がほしかった。(14件)
- ・マニュアルの整備。(3件)
- ・標準株配布(2件)
- ・勉強になった。
- ・質問したかった。
- ・クロストリジウム・ディフィシルについてもっと知りたい。
- ・最近の地見を知りたかった。また、内容にレベル差があった。
- ・国庫補助が必要。
- ・法律と耐性菌、院内感染、地衛研の役割について具体的な話が聞きたい。
- ・法的な位置付けの各部署での理解の必要性。
- ・パワーポイントの資料がほしかった。
- ・厚生省の話は内容に乏しかった。
- ・次回も参加したい。
- ・検査の具体的な話が聞きたかった。
- ・泉谷先生のサルモネラは解りやすかった。
- ・厚生省の話は不要。
- ・感染研で病院株が必要であれば送付します。
- ・異動により、担当者が変わるのが問題。
- ・遺伝子の話が聞きたかった。
- ・プロトコルを示してほしかった。
- ・内容が大変良いものなので、もう少し時間に余裕がほしい。
- ・進行ミス。

図4. 研修会に対する自由意見

- ESBL(12)
- ESBL-sequencing(1)
- MDRP(4)
- MDRP-MBL(3)
- MDRP-PFGE
- C.difficile(4)
- C.difficile-PFGE(1)
- VRE(8)
- VRE-phenotype, van sequencing(1)
- VRE-PFGE(3)
- MRSA (5)
- MRSA-MLST(1)
- MRSA-MIC(1)
- MRSA-PFGE(4)
- VRSA(1)
- VRSA-PFGE(1)
- Salmonella(1)
- Salmonella-disk method(1)
- Campylobacter(2)
- Campylobacter-MIC(1)
- TB-RFLP(1)
- TB-MDR+XDR検査法(1)
- Legionella spp.(1)

図5. 今後の研修会希望項目

( )内の数字は希望数

新型の薬剤耐性菌の耐性機構・立体構造の物理化学的解析とその耐性機構並びに

立体構造に基づいた検出剤の分子設計

研究分担者 黒崎 博雅

（熊本大学大学院医学薬学研究部 構造機能物理化学分野）

研究要旨

抗生物質に耐性を示す細菌の出現は薬物治療を困難にし、感染症治療を行う上で大きな脅威となっている。その耐性機構の1つに $\beta$ -lactamaseが挙げられる。クラスBに属するメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBLs) は活性部位に亜鉛(II)を持ち、ほとんどの抗生物質の $\beta$ -ラクタム剤を不活化する。1990年代よりわが国においてクラスB MBLのIMP-1による院内感染が報告され、これらの菌に対する検出法の開発が急務である。我々は臨床検査室などで迅速かつ簡便に測定可能であると考えられる蛍光プローブ法でMBL産生菌を検出することを目的としている。

本年度の研究では以前化学合成した蛍光剤  $N$ -[ $n$ -[5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido]alkyl]-3-mercaptopropionamide (DansylCnSH) とクラスB MBLに属するBla-b, IND-1aにおける本蛍光試薬の検出能について蛍光分光法を用いて検討した。また本蛍光試薬のMBLsに対する選択性を考慮するため、クラスA セリン- $\beta$ -ラクタマーゼに属するGES-3においても同様に検討した。DansylCnSHはBla-bまたはIND-1a共存下、いずれも蛍光強度は増大した。DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) の蛍光強度に及ぼすBla-b, IND-1aの濃度の効果から解離定数 $K_d$ を求め、蛍光剤とBla-b, IND-1aは1対1で結合することが分かった。セリン- $\beta$ -ラクタマーゼGES-3では、Bla-b並びにIND-1aとは異なりDansylC4SHとの蛍光スペクトル測定において蛍光強度の変化は見られなかった。

以上のことより、DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) はMBLsに対して選択的に結合し、蛍光検出試薬としてMBLs産生菌を簡便かつ高感度で検出することが期待される。

研究協力者

山口佳宏 熊本大学環境安全センター准教授

A. 研究目的

$\beta$ -ラクタマーゼは $\beta$ -ラクタム環を加水分解することで $\beta$ -ラクタム剤の抗菌活性を消失させる耐性機構の1つである。

$\beta$ -ラクタマーゼはAmbler等によってアミノ酸配列の相同性に基づき4つのクラスA, B, C, Dに分類される。クラスA, C, Dに属する $\beta$ -ラクタマーゼは活性中心にセリン残基を持つセリン酵素であり、一方、クラスBに属する $\beta$ -ラクタマーゼは活性中心に亜鉛(II)を有しており“メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ”(MBLs)と呼ばれている。MBLの中でもIMP-1遺伝子 $bla_{IMP}$ は日本で最初に発見されたが、伝達性プラスミド中に存在するインテグロン構造にカセットとして組み込まれているため、水平的に他の細菌に伝播することができ、日本以外でもIMP-1の単離が報告されている。そのため、臨床の場においてMBL産生菌の有無を迅速にかつ的確に確認することが重要で

あり、またそのような検出法の確立が急務とされている。

以前、我々は蛍光発色団ダンシル基とMBLであるIMP-1に対して強い阻害剤として働く3-メルカプトプロピオン酸をメチレン鎖の異なるジアミンのスペーサーで連結した蛍光剤  $N$ -[ $n$ -[5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido]alkyl]-3-mercaptopropionamide (DansylCnSH ( $n = 2 - 6$ )と略す、図1)を合成し、IMP-1との蛍光スペクトルの挙動について以前報告した。

本蛍光剤を用いた検出法の確立をする上で、本蛍光剤がIMP-1, VIM-2以外の種々のMBLsに対しても有効であること、また活性中心に亜鉛(II)を持たないセリン- $\beta$ -ラクタマーゼに対しては反応しないということを検証する必要がある。

そこで、臨床培養株から単離された *Chryseobacterium meningosepticum* 由来のBla-bならびに *Chryseobacterium indologenes* 由来のIND-1aを用いDansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) における蛍光特性について検討を行った。さらに、

*Klebsiella pneumoniae* 由来のクラス A セリン- $\beta$ -ラクタマーゼに属する GES-3 と DansylCnSH との蛍光スペクトルを測定した。

## B. 研究方法

*Chryseobacterium meningosepticum* 由来メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (Bla-b) の発現及び精製

*E. coli* XL-1 Blue (pET9a / Bla-b) からのプラスミド抽出、発現及び精製

### 1) プラスミド抽出、発現

*E. coli* XL-1 Blue (pET9a / Bla-b) から抽出したプラスミド 50  $\mu$ L と competent cell (*E. coli* BL21 (DE3)) 100  $\mu$ L を、マイクロチューブ (1.5 mL) 中で静かに撹拌した後、氷上に 30 分間放置した。42  $^{\circ}$ C の水浴中に 50 秒間置き、直ちに氷上に 2 分間放置した。その後予め 37  $^{\circ}$ C に保っておいた SOC 培地を 900  $\mu$ L 加え、37  $^{\circ}$ C、2 時間で振とう撹拌した。

### 2) 培養

振とう撹拌後の液を 50  $\mu$ g / mL カナマイシンを含む 5 mL LB 液体培地 (5 本) にそれぞれ 200  $\mu$ L 植菌し、37  $^{\circ}$ C で一晩振とう培養 (150 rpm) した。一晩培養した培養液を、50  $\mu$ g / mL カナマイシンを含む 2 L LB 液体培地 (5 本) にそれぞれ 10 mL 植菌し、37  $^{\circ}$ C で振とう培養 (150 rpm) した。2.5 時間後、分光光度計により Abs<sub>500</sub> の吸光度を測定し、1.0 付近であることを確認後、培養液中濃度が 1 mM となるように IPTG を添加し、37  $^{\circ}$ C で振とう培養 (150 rpm) した。6 時間後、培養液を回収し、4  $^{\circ}$ C で 15 分間遠心 (6,500  $\times$  g) し菌体を集めた。これを 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) 30 mL で懸濁し、4  $^{\circ}$ C で 30 分間遠心 (6,500  $\times$  g) し、湿菌重量で約 46 g の菌体を得た。湿菌重量 1 g に対して 1 mL の割合で 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) で菌体を再懸濁させ、氷浴中で 55 秒おきに 5 秒間の超音波破碎を 60 回行った。破碎した菌体液を 2  $^{\circ}$ C で 75 分間遠心 (100,000  $\times$  g) し、上清液を粗酵素溶液とした。

### 3) 精製

粗酵素溶液の精製はカラムクロマトグラフィーを使って行った。まず SP-Sepharose Fast Flow カラム ( $\phi$  26 mm  $\times$  10 cm, 流速 60 mL / h) を使い、粗酵素溶液を乗せ 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) で約 80 mL 洗浄のため流した。その後 buffer 液に NaCl 濃度を 0.1 M とし、同様に約 80 mL 洗浄のため流した。そして NaCl 濃度 (0.1-0.6 M) によって塩勾配をかけ、溶出させ 10 mL ずつ分取した。各分画に含まれるタンパク質濃度を 280 nm の吸光度を測定し求め、ニトロセフィン加水分解活性を有する分画を集めた。集められた液を Amicon YM-10 で 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.3 M NaCl) に変換し、約 30 mL に濃縮した。濃縮した活性分画を Sephadex

G-75 カラム ( $\phi$  26 mm  $\times$  80 cm, 流速 10 mL / h) を使い、酵素液を 10 mL ずつ 3 回に分け、50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.3 M NaCl) で 5 mL 毎に分取した。タンパク質を含む活性分画を集め、前述と同様に濃縮し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により単一バンドであることを確認し、この溶液を精製酵素として -80  $^{\circ}$ C で保存した。

### Bla-b の定量

Bla-b の濃度は分光光度法により求めた。すなわち、Bla-b のモル吸光係数を CBB 法で IMP-1 のモル吸光係数を元に補正し  $\epsilon_{280} = 41,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  とし、Bla-b 溶液の 280 nm における吸光度から濃度を算出した。

*Chryseobacterium indologenes* 由来メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IND-1a) の発現及び精製

*E. coli* XL-1 Blue (pET29a / IND-1a) からのプラスミド抽出、発現及び精製

### 1) プラスミド抽出、発現

プラスミドを *E. coli* XL-1 Blue (pET29a / IND-1a) に変更しその他は前述した方法に従った。とした。

### 2) 培養

変更点としてカナマイシンの濃度を 100  $\mu$ g / mL とした。培地を 10 mL、2 L の 2  $\times$  TY 液体培地とした。3.5 時間後に培養液中濃度が 0.1 mM となるように IPTG を添加した。2 時間後、培養液を回収し、菌体を集めた。これを 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 30 mL で懸濁し、遠心後、湿菌重量で約 40 g の菌体を得た。その菌体を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で再懸濁させ、超音波破碎を行った。破碎した菌体液を遠心し、上清液を回収後 MILLEX GP 0.45 mm フィルターで限外ろ過を行った。

### 3) 精製

変更点として①カラム: SP-Sepharose Fast Flow ( $\phi$  26 mm  $\times$  10 cm, 流速 60 mL / h)、buffer: 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)、勾配: NaCl 濃度 (0 ~ 1.0 M)。②カラム: Sephadex G-75 ( $\phi$  26 mm  $\times$  80 cm, 流速 10 mL / h)、buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.3 M NaCl)。③カラム: Hi Trap Phenyl HP (流速 60 mL / h)、buffer: 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 1 M 硫酸)、勾配: 硫酸濃度 (1.0 ~ 0 M)。④カラム: Sephacryl HR-100 ( $\phi$  16 mm  $\times$  80 cm, 流速 6 mL / h)、buffer: 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 0.3 M NaCl) の順序で行った。

### IND-1a の定量

IND-1a の濃度は分光光度法により求めた。すなわち、IND-1a のモル吸光係数を CBB 法で IMP-1 のモル吸光係数を元に補正し  $\epsilon_{280} = 34,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  とし、IND-1a 溶液の 280 nm における吸光度から濃度を算出した。

*Klebsiella pneumoniae* 由来セリン- $\beta$ -ラクタマー

ゼ (GES-3) の発現及び精製

*E. coli* XL-1 Blue (pET29a / GES-3) からのプラスミド抽出、発現及び精製

1) プラスミド抽出、発現

変更点としてプラスミドを *E. coli* XL-1 Blue (pET29a / GES-3) とした。

2) 培養

変更点として 3.5 時間後に分光光度計により  $Abs_{600}$  の吸光度を測定し、0.6 付近であることを確認後、培養液中濃度が 1 mM となるように IPTG を添加した。2 時間後、培養液を回収した。遠心し菌体を集め、これを 20 mM Bis-Tris buffer (pH 6.5) 30 mL で懸濁し、湿菌重量で約 23 g の菌体を得た。その菌体を 20 mM Bis-Tris buffer (pH 6.5) で再懸濁させ、超音波破碎を行った。

3) 精製

変更点として①カラム: Q Sepharose Fast Flow ( $\phi$  26 mm  $\times$  10 cm, 流速 60 mL / h), buffer: 20 mM Bis-Tris buffer (pH 6.5)。②カラム: Q Sepharose Fast Flow ( $\phi$  26 mm  $\times$  10 cm, 流速 60 mL / h), buffer: 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 勾配: NaCl 濃度 (0-0.5 M)。③カラム: Sephacryl HR-100 ( $\phi$  16 mm  $\times$  80 cm, 流速 6 mL / h), buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.3 M NaCl) の順序で行った。

GES-3 の定量

GES-3 の濃度は分光光度法により求めた。すなわち、GES-3 のモル吸光係数を CBB 法で IMP-1 のモル吸光係数を元に補正し  $\epsilon_{280} = 25,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  とし、GES-3 溶液の 280 nm における吸光度から濃度を算出した。

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (Bla-b, IND-1a) 及びセリン- $\beta$ -ラクタマーゼ (GES-3) による蛍光剤 DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) の蛍光特性の変化

蛍光スペクトル測定は 25 °C、スリット幅 5.0 nm の条件下、励起波長 340 nm (測定波長: 400 nm から 650 nm) としてメタノール 10 % を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl) 緩衝液を用いて行った。DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) を用い、各々の蛍光剤の濃度が 100  $\mu\text{M}$  になるようにメタノール (紫外吸収スペクトル用) で調製し、測定の際はこの溶液を 30  $\mu\text{L}$  とり 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl) で全量 3 mL にして、測定溶液中 1  $\mu\text{M}$  の濃度になるようにした。酵素溶液として Bla-b, IND-1a, GES-3 を用い、各種の蛍光剤におけるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼによる蛍光特性の変化について検討を行った。酵素溶液は全て 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl) 緩衝液で調製し、蛍光スペクトル測定の際には適宜測定溶液に加えた。

DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) とメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (Bla-b, IND-1a) との解離定数の決定

1  $\mu\text{M}$  の DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) 溶液に酵

素 (Bla-b, IND-1a) 濃度が測定溶液中 0.1 から 10  $\mu\text{M}$  になるように酵素溶液を適宜加えていき、励起波長 340 nm として蛍光スペクトルを測定した。さらに、535 nm における蛍光強度を酵素濃度に対してプロットし (6) 式の回帰曲線にあてはめ、解離定数  $K_d$  を求めた。

$$[\text{DansylCnSH- MBL}] \quad [\text{DansylCnSH}] + [\text{MBL}] \quad (1)$$

この時の 1 : 1 の解離定数  $K_d$  を (2) 式のように定義する。

$$K_d = \frac{[\text{DansylCnSH}][\text{MBL}]}{[\text{DansylCnSH- MBL}]} \quad (2)$$

ここで

$$[\text{DansylCnSH}]_{\text{tot}} = [\text{DansylCnSH}]_{\text{free}} + [\text{DansylCnSH- MBL}] \quad (3)$$

$$[\text{MBL}]_{\text{tot}} = [\text{MBL}]_{\text{free}} + [\text{DansylCnSH- MBL}] \quad (4)$$

次いで観測される蛍光強度 FI は (5) 式のように表すことができる

$$FI = a \times \frac{[\text{DansylCnSH- MBL}]}{[\text{DansylCnSH}]_{\text{tot}}} + b \frac{[\text{DansylCnSH}]_{\text{free}}}{[\text{DansylCnSH}]_{\text{tot}}} \quad (5)$$

ここで、

a : 十分量の Bla-b, または IND-1a 存在下における

DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) の蛍光強度

b : Bla-b, または IND-1a 非存在下における DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) の蛍光強度

式 (2), (3), (4), (5) より、

$$FI = ax$$

$$\frac{Kd + [\text{MBL}]_{\text{tot}} + 1 - \sqrt{(Kd + [\text{MBL}]_{\text{tot}} + 1)^2 - 4[\text{MBL}]_{\text{tot}}}}{2}$$

$$- b \times$$

$$\frac{1 - Kd - [\text{MBL}]_{\text{tot}} + \sqrt{(Kd + [\text{MBL}]_{\text{tot}} + 1)^2 - 4[\text{MBL}]_{\text{tot}}}}{2} \quad (6)$$

## C. 研究結果

Bla-b 共存下の DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) の蛍光スペクトル変化

Bla-b は *C. meningosepticum* 由来の MBL で、IMP-1, VIM-2 との amino acid 配列相同性はそれぞれ 31 と 37 % である。そこで DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) による蛍光特性の変化を観察するために、Bla-b でも IMP-1, VIM-2 と同様に 340 nm で励起して、Bla-b 非存在下及び存在下における蛍光剤の蛍光スペクトルを測定した。340 nm で励起すると 1  $\mu\text{M}$  の蛍光剤

のみでは極大波長約 535 nm を示す蛍光スペクトルを得た。等モルの Bla-b 存在下では蛍光強度は増大し、各々の極大波長は DansylC2SH のとき 532 nm、DansylC4SH のとき 533 nm、DansylC5SH のとき 533 nm、DansylC6SH のとき 532 nm となり、いずれも短波長側へシフトした。

Bla-b 存在下及び非存在下における蛍光強度比を求めた (図 2)。各々の蛍光強度比は 1.46 (DansylC2SH)、1.43 (DansylC4SH)、1.31 (DansylC5SH)、1.29 (DansylC6SH) となった。以上より、等モルの Bla-b 存在下では蛍光強度が増大し、それぞれの差はほとんど見られなかった。

DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) と Bla-b との解離定数の決定

Bla-b 存在下では DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) の蛍光強度は増大することが分かったため、その蛍光強度に及ぼす Bla-b の濃度依存性について検討を行った。その結果を図 3 に示す。図 3 より  $1 \mu\text{M}$  の DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) に Bla-b を段階的に添加していくと、Bla-b 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 と DansylC4SH のとき 530 nm、DansylC5SH のとき 532 nm、DansylC6SH のとき 531 nm へとシフトし、いずれも低波長側へシフトした (表 1)。

そこで 535 nm における蛍光強度を Bla-b の濃度に対してプロットした (図 4)。すると、いずれの蛍光剤においても Bla-b 濃度が  $1 \mu\text{M}$  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、 $\text{DansylCnSH} + \text{Bla-b} \rightleftharpoons \text{DansylCnSH} \cdot \text{Bla-b}$  として解析することができ、(6) 式の回帰曲線から解離定数  $K_d$  を求めた (表 1)。各々の解離定数  $K_d$  は  $2.3 \mu\text{M}$  (DansylC2SH)、 $2.0 \mu\text{M}$  (DansylC4SH)、 $1.9 \mu\text{M}$  (DansylC5SH)、 $2.0 \mu\text{M}$  (DansylC6SH) となった。これらの値より、蛍光強度比と同じく差はほとんど見られなかった。

IND-1a 共存下の DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) の蛍光スペクトル変化

IND-1a は IMP-1、VIM-2 とそれぞれ 32、37 % のアミノ酸配列相同性を示す MBL であり、また Bla-b とのアミノ酸配列相同性は 43 % ということが報告されている。IND-1a 存在下及び非存在下における 535 nm での蛍光強度比を求めた (図 5)。

各々の蛍光強度比 (図 5) は 1.25 (DansylC2SH)、1.27 (DansylC4SH)、1.15 (DansylC5SH)、1.14 (DansylC6SH) となった。以上より、等モルの IND-1a 存在下では Bla-b 同様に蛍光強度が増大し、それぞれの差はほとんど見られなかった。

DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) と IND-1a との解離定数の決定

IND-1a 存在下では DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) の

蛍光強度は増大することが分かったため、その蛍光強度に及ぼす IND-1a の濃度依存性について検討を行った。その結果を図 6 に示す。得られた蛍光スペクトルより、535 nm における蛍光強度を IND-1a 濃度に対してプロットし (6) 式の回帰曲線にあてはめて解離定数  $K_d$  を求めた (表 2)。

各々の解離定数  $K_d$  は  $4.8 \mu\text{M}$  (DansylC2SH)、 $3.3 \mu\text{M}$  (DansylC4SH)、 $3.8 \mu\text{M}$  (DansylC5SH)、 $3.1 \mu\text{M}$  (DansylC6SH) となった。これらの値より Bla-b 同様、蛍光強度比と同じく差はほとんど見られなかった。

セリン- $\beta$ -ラクタマーゼ (GES-3) による蛍光剤の蛍光特性の変化

DansylC4SH ( $n = 4$ ) を用いた GES-3 非存在下及び非存在下における蛍光スペクトルを図 7 に示した。GES-3 共存下において蛍光スペクトルの変化は見られず、蛍光強度の上昇が観測されなかった。

## D. 考 察

Bla-b での蛍光特性及び阻害活性

今回の Bla-b における蛍光特性及び阻害活性において、以前報告した IMP-1、VIM-2 における解離定数  $K_d$  と阻害定数  $K_i$  を大きく上回った。これは IMP-1 と DansylC4SH の相互作用に重要な 64 位の Trp の存在が VIM-2、Bla-b では Ala、Thr となっているため (図 8)、IMP-1 でみられた相互作用がないことから結合能が弱まったと考えられる。また、IMP-1、VIM-2 の loop 2 領域に位置する 233 位の Asn が Bla-b では Tyr となっている。Tyr は Asn よりもかさ高いことから Bla-b では Tyr が活性部位の空間を狭くすることで蛍光剤との結合に障害をきたしていると考えられた (図 9)。

そこで VIM-2、Bla-b の DansylC4SH との結合において、IMP-1 と DansylC4SH の結合様式とは異なることが考えられたため、VIM-2、Bla-b (PDB: 1M2X) と DansylC4SH のそれぞれの PDB 構造を用いて MOE-AS\_Dock によるドッキングシミュレーションを行い、それぞれの構造をモデリングした。力場は MMFF94s を使い、DansylC4SH のチオール基と 2 個の亜鉛との距離を  $2.0 \sim 2.5 \text{ \AA}$  の距離に制限し、VIM-2 においては 1000 種類、Bla-b においては 998 種類の結合の取り方を行った。このドッキングシミュレーションの結果で、力場によるドッキングエネルギー (リガンドの内部エネルギーとリガンド-レセプター間の相互作用エネルギーの合計) が一番低かったモデリングの結果を図 10 に示す。

モデリングの結果 (図 10)、VIM-2、Bla-b に結合した DansylC4SH の位置は IMP-1 とは違い、IMP-1 と異なった結合様式を取ることが裏付けられた。またシミュレーションにおける他の結合の取り方で、VIM-2 においては DansylC4SH の位置はほとんど変化がなかったが、Bla-b においては DansylC4SH の動きに変

化が見られ多様な位置を取っていた。これは loop 1 領域と loop 2 領域で形成されている溝の隔たりが VIM-2 に比べて Bla-b が少ない (VIM-2 の溝の広さ < Bla-b の溝の広さ) ため、Bla-b における DansylC4SH の位置が動く結果になったと考えられる。さらに蛍光強度の比較を考慮すると、IMP-1 や VIM-2 では蛍光強度が側鎖の変化により値が影響するが、Bla-b の蛍光強度は側鎖の変化による影響がほとんどなく、またその蛍光強度は IMP-1 や VIM-2 と比較すると弱い。これは、

1. VIM-2 ではアミノ酸残基 (Asp 117, Asp 213, Glu 146 など) があり、それらとダンシル基が相互作用をする可能性がある。(図 10)
2. VIM-2 は Bla-b よりも溝が狭く、しっかりととはまった状態になる。
3. Bla-b では溝が VIM-2 よりも多少広いため DansylC4SH の動きが制限されず、その動きによりアミノ酸残基と相互作用を取りにくい。

以上のことが考えられる。

#### IND-1a での蛍光特性

今回の IND-1a の結果は Bla-b と同じく IMP-1, VIM-2 と比較すると  $K_d$  値は高かった。これは Bla-b での考察でも述べたが 64 位のアミノ酸残基が Trp ではなく Lys となっていることや (図 11)、Bla-b とのアミノ酸配列相同性が 43% であり、loop 2 領域のアミノ酸配列が似ている (233 位のアミノ酸残基が同じ Tyr) こと、また Bla-b と同じく IMP-1 とは異なった結合様式をとることなどが考えられる。そのためこれらの違いが DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) との結合において影響があると考えられた。

#### F. 総括

DansylCnSH は Bla-b または IND-1a を加え 340 nm で励起すると、蛍光強度の増大が観測された。さらに、DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) と Bla-b は 1 対 1 で結合するとして解析できた。Bla-b と IND-1a

の DansylCnSH に対する  $K_d$  値は IMP-1 や VIM-2 のそれらよりも大きな値となった。これらの  $K_d$  値の上昇は 64 位の Trp の存在や、loop 2 領域のアミノ酸配列相同性などが影響していると考えられた。また VIM-2, Bla-b と DansylC4SH のモデリングの結果、DansylC4SH の結合位置が共に IMP-1 と異なる位置を取ることが考えられた。さらに他の結合様式により Bla-b では DansylC4SH が多様な位置を取っていたため、この DansylC4SH の動きも IMP-1, VIM-2, Bla-b の蛍光強度に関与していると考えられた。

Bla-b とのアミノ酸相同性 43% である IND-1a においても Bla-b と同様に蛍光強度の増大が観測された。Bla-b と比較すると  $K_d$  値はわずかに高い値を示した。

一方、活性中心に金属を持たない GES-3 においては予想通り蛍光強度の上昇が観測されなかった。

これらの結果から、DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) が MBL に対して有効な蛍光検出剤であることが裏付けられた。

#### G. 研究発表

該当なし

#### H. 知的所有権の取得状況

特許第 4175608 号

発明の名称

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ測定用試薬

特許権者

財団法人くまもとテクノ産業財団

発明者

後藤正文

黒崎博雅

荒川宜親

出願番号 2002-08827

出願年月日 平成 14 年 3 月 27 日

登録日 平成 20 年 8 月 29 日

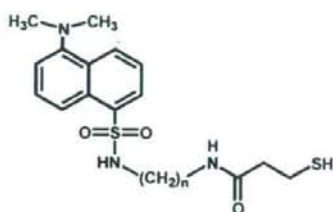


Fig. 1. Chemical structure of DansylCnSH ( $n = 2, 4, 5,$  and  $6$ )

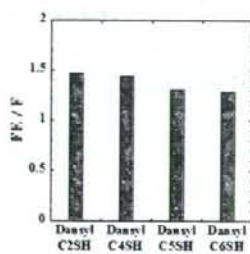


Fig. 2. Ratio of fluorescence intensity. FE is the fluorescence intensity of Dansyl derivatives in the presence of Bta-b and F is the fluorescence intensity in the absence of Bta-b

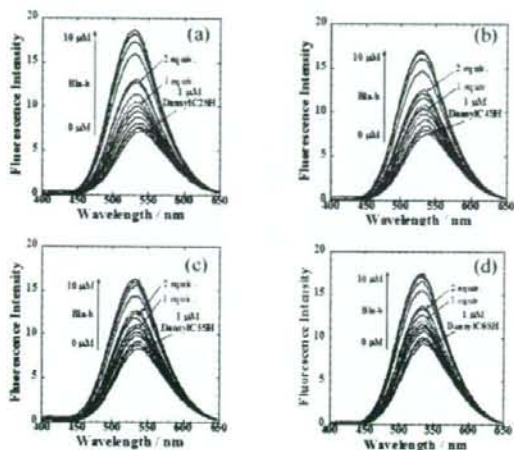


Fig. 3. Fluorescence emission spectra (excitation 340 nm) of 1 mM Dams I derivatives with increasing concentration of Bla-b ranging from 0 to 10  $\mu$ M: (a) Dams IC7SH, (b) Dams IC4SH, (c) Dams IC5SH, (d) Dams IC6SH. Red, 1  $\mu$ M of Bla-b; blue, 2  $\mu$ M of Bla-b. These spectra were measured at 25  $^{\circ}$ C in 50 mM Tris-HCl buffered solution (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl and 10 % methanol.

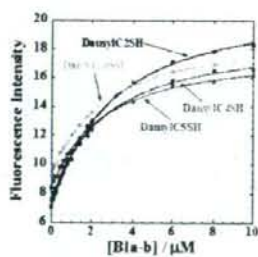


Fig. 4. Dependence of fluorescence intensity at 535 nm of Dams IC6SH ( $n = 2, 4, 5$ , and 6).

Table 1. Dissociation constants and  $\lambda_{max}$  of Dams IC6SH ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) with Bla-b

Dams IC6SH	$K_d / \mu$ M	$\lambda_{max} / \text{nm}$
Dams IC7SH	2.3 $\pm$ 0.1	530
Dams IC4SH	2.0 $\pm$ 0.2	530
Dams IC5SH	1.9 $\pm$ 0.1	532
Dams IC6SH	2.0 $\pm$ 0.1	531



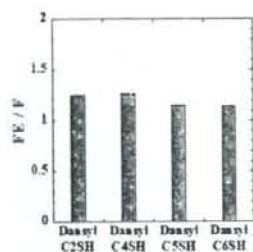


Fig. 5. Ratio of fluorescence intensity. FE is the fluorescence intensity of Dansyl derivatives in the presence of IND-1a and F is the fluorescence intensity in the absence of IND-1a.

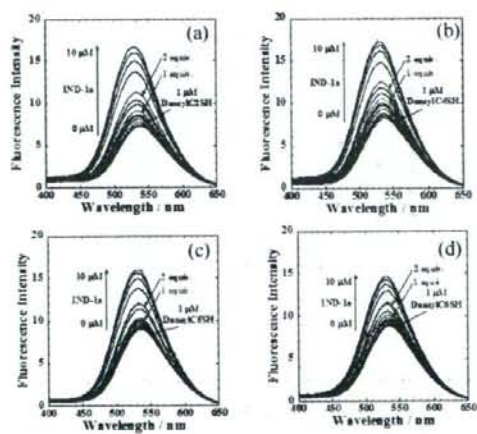


Fig. 6. Fluorescence emission spectra (excitation 340 nm) of 1 mM Dansyl C<sub>n</sub>SH (*n* = 2, 4, 5, 6) with increasing concentration of IND-1a ranging from 0 to 10 nM. (a) Dansyl C2SH, (b) Dansyl C4SH, (c) Dansyl C5SH, (d) Dansyl C6SH. Red: 1 equiv. of IND-1a, blue: 2 equiv. of IND-1a. These spectra were measured at 25 °C, in 50 mM Tris-HCl buffered solution (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl and 10<sup>-6</sup>% methanol.

**Table 2.** Dissociation constants and  $\lambda_{max}$  of DamsIC5H ( $n = 2, 4, 5, 6$ ) with FND-1a

DamsIC5H	$K_d / \mu\text{M}$	$\lambda_{max} / \text{nm}$
DamsIC25H	4.8x10 <sup>-7</sup>	531
DamsIC45H	3.3x10 <sup>-5</sup>	531
DamsIC55H	3.8x10 <sup>-5</sup>	532
DamsIC65H	3.1x10 <sup>-4</sup>	532

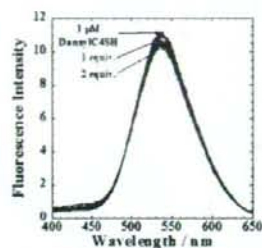


Fig. 7. Fluorescence emission spectra (excitation 340 nm) of 1  $\mu\text{M}$  DamsIC45H with increasing concentration of GEs-3 ranging from 0 to 2  $\mu\text{M}$ . Red, 1 equiv. of GEs-3; blue, 2 equiv. of GEs-3. These spectra were measured at 25 °C, in 50 mM Tris-HCl buffered solution (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl and 10% methanol.

	p3	Loop 1	p4	Loop 2
IMP-1:	..E E V N G	<b>W</b> 64	G V V P.....L	- - G <b>W</b> 233 L G D A..
VIM-2:	**Q S F D G	A	- V Y P.....T S A G	H V A D A..
Bla-b:	**N T F M G	T	- K Y A.....K D L G	Y I G R A..

Fig. 8. Comparison of the loop of IMP-1, VIM-2 and Bla-b

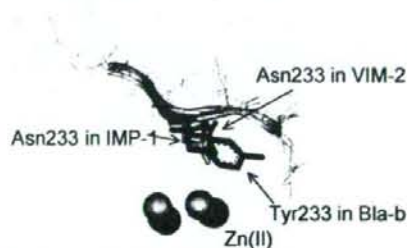


Fig. 9. Comparison of the active site of IMP-1, VIM-2, and Bla-b

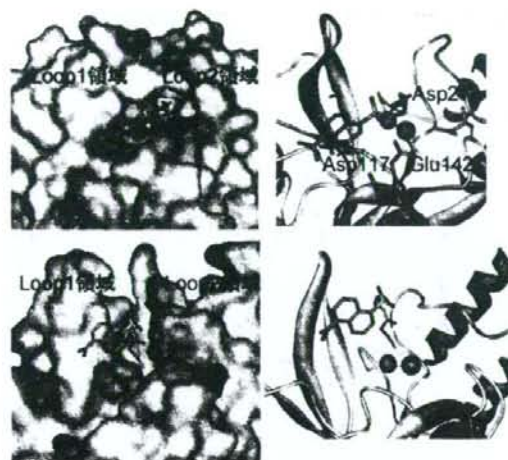


Fig. 10. Modeling of VIM-2 (top) or Bla-b (bottom) and Dano K45H

	$\beta 3$	Loop 1	$\beta 4$	Loop 2
		64		233
IMP-1:	**E E V N C	<b>G</b>	C V V P.....L - - C	<b>M</b> L G D A**
VIM-2:	**Q S F D G A	-	V Y P.....T S A G	<b>N</b> V A D A**
Bla-b:	**M T F M G T	-	K Y R.....K D L G	<b>V</b> I G E A**
IND-1a:	**G V F G G K	-	E Y S.....T D L G	<b>V</b> I K E A**

Fig. 11. Comparison of the loop of IMP-1, VIM-2, Bla-b, and IND-1a

## クラスDに属するβ-ラクタマーゼの検出法確立に関する基礎的検討

研究分担者 山口 恵三（東邦大学医学部 微生物・感染症学）

### 研究要旨

今年度の研究では、クラスDに属するβ-ラクタマーゼのうち、OXA-23およびOXA-40については、昨年度得られた酵素標品を家兎に免疫し、抗血清の作成を終了した。得られた抗血清からポリクローナル抗体(IgG)を精製して、OXA-23およびOXA-40に対するウエスタンブロッディング法、ELISA法およびイムノクロマト法による検出系を確立した。また、OXA-51およびOXA-58の大量発現系の構築および酵素標品の取得に成功し、現在抗血清を作成している。

### 研究協力者

石井 良和 微生物・感染症学 助教  
嵯峨 知生 微生物・感染症学 助教  
神山 裕一 微生物・感染症学 大学院生

### A. 研究目的

β-ラクタマーゼは、グラム陰性菌のβ-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。β-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。欧米では、クラスDに属するβ-ラクタマーゼを産生する多剤耐性緑膿菌や多剤耐性アシネトバクターによる院内感染が発生して社会問題となっているが、本邦ではクラスDに属するβ-ラクタマーゼはあまり注目されていないのが現状である。しかし、東邦大学医療センター大森病院において2008年に分離された2株のイミペネム耐性アシネトバクターがOXA-23産生株であった。したがって、本研究ではOXA-型カルバペネマーゼの病院検査室で使用可能な検出法確立にその目的を絞って基礎的検討を実施した。

### B. 研究方法

OXA-型β-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、相同性が低い複数の酵素群から形成される大きなグループであった。しかし、カルバペネム系薬分解型酵素は大きく2つのグループから形成されることが判明した。その中から、グループ6と呼ばれる主としてアシネトバクター属菌が産生する酵素の大

量産生系の構築、酵素の大量精製、抗体の作成を実施した。これらのカルバペネマーゼ産生株は日本には存在しないことから、外国の研究者の協力を得てOXA-23、OXA-40、OXA-51およびOXA-58産生株を収集した。これらの菌株を供試菌株として、1)各構造遺伝子のPCRクローニング、2)大量発現ベクターへの導入、3)大量発現系の構築、4)精製法の確立、5)ウサギポリクローナル抗体の作成、6)ウエスタンブロット法による検出法の構築、7)ELISA法による検出法の構築、8)イムノクロマト法による検出法の構築を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 大量発現系の構築

OXA-23およびOXA-40は、pET系ベクターを用いて大量発現系の構築に成功した。一方、OXA-51型およびOXA-58型の大量発現系も同ベクターを用いてその構築を試みたが、発現量が極めて低く高純度の酵素を得るには至らなかった。そこで、pColdベクターを用いてコールドショックプロテインのプロモータの制御下にOXA-51あるいはOXA-58の遺伝子を置いたところ、両酵素の大量発現系の構築に成功した。

#### 2. 精製方法の確立

大量発現系が構築された全てのOXA-型酵素は、N-末端あるいはC-末端にHis-tagが付与されている。したがって、その精製にはニッケルカラムを用いて簡便かつ迅速に行うことができる。

#### 3. 抗体作成

これまでに、家兎に各酵素標品を免疫して、抗 OXA-23 および抗 OXA-40 家兎血清を得た。現在、OXA-51 および OXA-58 の酵素標品を家兎に免疫し、抗血清を作成している。なお、本抗体作成はイムノプローブ社（埼玉県）に業務委託した。

#### 4. 検出系の構築

抗 OXA-23 および抗 OXA-40 に対する抗血清作成終了と同時にウエスタンブロッティング法および ELISA による検出系を構築した。ELISA では酵素を 100,000 倍希釈すると特異性が高くなることを確認した。しかし、得られる吸光度が 0.7 前後と低いことなどから、得られた抗体の結合親和性は低いと考えられた。しかし、今回作成した抗 OXA-23 および抗 OXA-40 抗体は抗体価・特異性ともに高いことが確認された。抗原-抗体の親和性が低いことは、酵素学的にも確認された。すなわち、両抗体ともに各々の酵素の酵素活性を低下させるほどの親和性は有していなかった。ウエスタンブロッティング法では、抗体を 10,000 倍希釈したところ極めて良好な結果が得られた。ELISA による検出系では、抗 OXA-40 抗体と OXA-23 は反応しなかったが、抗 OXA-23 抗体は OXA-40 と弱いながら反応が認められた。

ELISA 法やウエスタンブロッティング法は感度がよく実験室では汎用される方法である。しかし、臨床検査室における日常検査の一環として実施するための方法として適しているとはいえない。日常検査として実施される方法としては、凝集法あるいはイムノクロマト法などが汎用されている。当初、凝集法による検出を検討したが、今回作成した抗体の特性からイムノクロマト法による検出を目指さざるを得なかった。イムノクロマト法でも抗 OXA-23 抗体を用いた OXA-23 の検出、抗 OXA-40 抗体を用いた OXA-40 の検出はいずれもその感度が低く、実用化に至らないことが明らかとなった。

ELISA 法の検討の際、抗 OXA-23 抗体および抗 OXA-40 抗体を混合して両酵素の検出を試みたところ、OXA-23 にも OXA-40 にも単独の抗体と反応させた場合と同様の結果が得られていた。そこで、イムノクロマト法でも抗 OXA-23 抗体および抗 OXA-40 抗体を混合した検出法について検討した。その結果、イムノクロマト法では抗体混合液を用いた系では十分な感度が得られることが明らかとなった。

#### D. 考察

今年度は、OXA-23 あるいは OXA-40 をイムノクロマト法により検出することができた。これまで OXA-型に属する酵素は特異的阻害剤が存在しないことから、薬剤感受性試験成績をもとにその産生の有無を推察することもできなかった。今回得られた成果は細菌検査における日常業務の一環として実施可能な簡便かつ迅速な方法である。すなわち、イムノクロマト法では菌液調整から判定までの一連の作業が 30 分という非常に短時間で終了する。感度・特異度など、今後検討すべき課題はあると考えている。

私どもはこれまでに、臨床材料から分離された菌株を用いて OXA-23 の検出を試みた。その結果、これまで知られていなかったが、本邦にも OXA-23 産生株が存在していることが明らかとなった。今後は、国内外の研究者の協力を得ながら開発を進める予定である。

#### F. 健康危険情報

2009 年 1 月 23 日に多剤耐性アシネトバクター属菌による日本初の院内感染発生が報道された。原因となったアシネトバクター属菌がグループ 6 に属する OXA-型カルバペネマーゼを産生するか否かは不明である。しかし、韓国や中国、台湾を含むアジア諸国、米国、イギリスやイタリア、ギリシャ、トルコをはじめとするヨーロッパ諸国、中東諸国でグループ 6 に属する OXA-型カルバペネマーゼ産生菌による院内感染が多いことは周知の事実である。特に人工呼吸器関連肺炎の原因微生物としてアシネトバクター属菌は知られていた。アシネトバクター属菌の乾燥抵抗性という細菌学的特長とも相俟って、今後本邦でも多剤耐性アシネトバクター属菌の蔓延が危惧される。

#### G. 研究発表

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.

#### H. 知的所有権の取得状況 特許出願中（特願 2009-12842）

## 肺炎球菌におけるマクロライド耐性機構の解析

研究分担者 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

今年度の研究では、臨床より分離された肺炎球菌の Telithromycin(TEL) 低感受性が、従来知られている 23SrRNA の薬剤結合部位や riboprotein 遺伝子の変異ではなく、外来性耐性因子の獲得によるものであることを明らかにした。外来性因子 *mefE* と *ermB* の欠損株を構築して、TEL 低感受性化への貢献度を検討したところ、*mefE* 欠損では MIC が一段階、*ermB* 欠損株の MIC は二段階低下したが、感受性レベルまでは低下しなかった。一方、*mefE* と *ermB* の 2 重欠損により MIC は感受性レベルまで低下したことから、*mefE* と *ermB* を両方獲得することにより TEL 低感受性化すると結論付けられた。*mefE* と *ermB* 獲得の遺伝学的背景を明らかにするため、Transposon の存在を検討した。その結果 *ermB*, *mefF*, *tet* をコードする Tn2010-like structure が見出されたことから、3 株の TEL 低感受性菌は Tn2010 の転移により出現したと考えられた。

## 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、肺炎球菌の TEL 耐性化の現況を明らかにし、耐性機構の解明をめざす。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°C、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. 遺伝子破壊株の構築：標的遺伝子を大腸菌のプラスミドにクローニングし、カナマイシン耐性カセットあるいはスペクチノマイシン耐性カセットを挿入して遺伝子を破壊した。これらを用いて肺炎球菌を形質転換し、相同的組み換えによって遺伝子破壊株を構築した。

4. PCR, DNA 塩基配列決定は定法に従った。

## C. 研究結果

1) 昨年度、国内の 1 医療機関において分離された肺炎球菌 120 株のマクロライド・ケトライド耐性を検討した結果、88%が Erythromycin (EM)などのマクロライド系抗菌薬に対する耐性を獲得していた。この中に TEL 低感受性菌が 3 株含まれていた。これらは PFGE 解析により独立したクローンであることを確認された。3 株について遺伝子解析を行った結果 23SrRNA の薬剤結合部位には変異が起きていないことが明らかとなり、低感受性化には rRNA 変異以外の要因、すなわち外来性耐性関連因子 *mefE* と *ermB* の寄与が考えられた (表 1)。

2) 外来性因子である *mefE* と *ermB* の欠損株を構築して、TEL 低感受性化への貢献度を検討した。肺炎球菌は増殖の定常期に入ると急速に死滅することから、他菌種で用いられる遺伝学的手法による解析が容易ではない。この急激な死滅の原因は自殺遺

伝子と呼ばれる *spxB* の働きによって菌体内外に蓄積する過酸化水素にあると考えられたことから、培地にカタラーゼを添加して培養したところ、急速な死滅を防ぐことが可能となり、形質転換並びに遺伝子破壊株構築の効率を大きく改善することができた。また、*spxB* 破壊によっても同様に改善することができた。ここではカタラーゼ添加法を用いて臨床分離3株の *mefE* と *ermB* の欠損株を構築した。*mefE* 欠損では MIC(TEL)が一段階、*ermB* 欠損株では二段階低下したが、感受性株レベルまでは低下しなかった。一方、*mefE* と *ermB* の2重欠損により MIC(TEL)は感受性レベルまで低下したことから、*mefE* と *ermB* を両方獲得することによる TEL 低感受性化すると結論付けられた(表2)。

表 1 2005-2006 年臨床分離 TEL 低感受性肺炎球菌の耐性関連形質

ATCC49619: MIC(TEL)=<0.007					
Strain	MIC (TEL) [μg/ml]	23S rRNA		L4	L22
		Domain II	Domain V		
CS43	0.5	wild type	wild type	S20N	wild type
CS88	1.0	wild type	wild type	S20S	wild type
CS120	1.0	wild type	wild type	S20S	wild type

表 2 臨床分離 TEL 低感受性肺炎球菌の *mefE*, *ermB* 欠損株の MIC(TEL μg/ml)

Strain	ATCC 49619	S43	S88	S120
<i>mefE</i> + <i>ermB</i> +	<0.015	0.5	1	0.5
∃ <i>mefE</i>	-	0.06	0.25	0.12
∃ <i>ermB</i>	-	0.12	0.25	0.12
∃ <i>mefE</i> ∃ <i>ermB</i>	-	<0.015	<0.015	<0.015

3) *mefE* と *ermB* 獲得の遺伝学的背景を明らかにするため、Transposon の存在を PCR ならびに Southern Hybridization により検討した。その結果 *ermB*, *mefE*, *tet* をコードする Tn2010-like structure が見出されたことから、3 株の TEL 低感受性菌は Tn2010 (図1) の転移により出現したと考えられた。なお、CS88 と CS120 の *tet* には変異が入っておりテトラサイクリン耐性は発現していなかった。

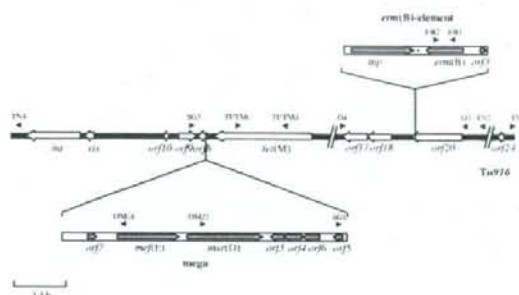


図 1 臨床分離 TEL 低感受性肺炎球菌 3 株に確認された Tn2610

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、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。現在のところ当該遺伝子のクローニングに成功していない。クローニング困難な理由の一つは、クローニングの宿主となる大腸菌のマクロライド非感受性であることから、宿主として有効な大腸菌の感受性株の構築によってこの問題を解決することができると考えている。

#### D. 結論

2005-2006 年に国内の医療機関で分離された TEL 低感受性肺炎球菌では、23SrRNA の薬剤結合部位には変異が起きておらず、低感受性化には rRNA 変異以外の要因が考えられた。外来性因子である *mefE* と *ermB* の欠損株を構築して、TEL 低感受性化への貢献度を検討したところ、*mefE* 欠損では MIC が一段階、*ermB* 欠損株の MIC は二段階低下したが、感

受性株レベルまでは低下しなかった。一方、*mefE* と *ermB* の 2 重欠損により MIC は感受性レベルまで低下したことから、*mefE* と *ermB* を両方獲得することによる TEL 低感受性化すると結論付けられた。トランスポソンの解析により 3 株の TEL 低感受性菌は *mefE* と *erm* を有する Tn2010 の転移により出現したと考えられた。

本研究によりマクロライドのみの使用によっても容易にケトライドに低感受性菌が出現することが明らかとなったが、これらの低感受性菌がさらに耐性化する可能性が予想されることから、その動向に注目する必要がある。

## E. 研究発表

### 1. 学会発表

北川奈緒美、高屋明子、横山栄二、山本友子  
臨床分離肺炎球菌のケトライド耐性機構 第 91 回  
日本細菌学会関東支部総会

北川奈緒美、高屋明子、岡崎充宏、遠藤菊太郎、横山栄二、山本友子  
臨床分離肺炎球菌の *mef(E)* *ermB* に関連したケトライド低感受性 第 82 回日本細菌学会総会

## F. 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



平成 20 年度分担研究報告書(総括)

血清型 6B, 6A 及び 19F 肺炎球菌の MLST と薬剤感受性の関連

研究分担者 和田昭仁（国立感染症研究所 細菌第一部）

要旨

成人においても小児においても高頻度で分離され、ペニシリン耐性が問題となっている血清型 6B, 19F 肺炎球菌のシーケンスタイプ解析をおこなった。6B のシーケンスタイプ ST90 は、13 株中 12 株でペニシリン G の MIC が 1-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、ST902 ではペニシリン G の MIC は 6 株全て 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。血清型 19F には 8 種類のシーケンスタイプが見られたが、これはアレル *ddl* の配列の相違によるものであった。ペニシリン G の MIC は ST236 が 1-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ST926 が 1-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示した。ペニシリン耐性と *ddl* の配列との関連性につき、今後の解析が必要であると考えられた。

A. 研究目的

コンジュゲート肺炎球菌ワクチンが未導入の本邦においては、侵襲性感染由来の血清型 6B 肺炎球菌は小児においても成人においても 30% を超える分離率を示している。また、6A, 19F による侵襲性感染症も小児、成人共に見られている。これらの血清型においては、ペニシリンに対して感受性が低下した菌が分離されることが多く、治療上の問題となっている。本年度の研究では、血清型 6B, 6A, 19F 肺炎球菌の薬剤感受性とシーケンスタイプの関連について解析を行った。

B. 研究対象及び方法

5 歳未満の小児から分離された血清型 6B (29 株), 6A (7 株), 19F (14 株)

とそれ以外の年齢層の患者さんから分離された血清型 6B (8 株), 6A (1 株), 19F (1 株)、計 60 株を対象とした。荚膜血清型は、Statens Serum Institut 製群別、型別および因子血清をもちい膨潤法により判定した。薬剤感受性は、栄研ドライプレートをもちい、CLSI M100-S18 に準拠し試験を行った。シーケンスタイプは、<http://spneumoniae.mlst.net/> に記載されている方法に基づき、肺炎球菌の遺伝子(*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*)の配列を決定し、既存のデータベースとの比較を行った。

C. 研究結果

血清型 6B, 19F の分離菌の 70.3%

(26/37)、80% (12/15)はPCG MICが1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であった。血清型6Bには15種類のシークエンスタイプ (ST)が見られ、その中で、ST90 (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*: 5,6,1,2,6,3,4)が13株 (35.1%)、ST902 (2,13,2,1,6,121,121)が6株 (16.2%)分離されていた。ST90は1株を除きPCGのMICが1-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ST902のPCGのMICは全て2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

血清型 6A、8株中に共通する ST はなかったが、6B と同じ ST (5,6,1,2,6',1,271)を示す株が 1 株見られた。PCG の MIC は 0.015-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の分布を示した(6'はアリル 6 の配列と 1 bp の相違)。

血清型 19F には 8 種類の ST が見られ、ST236 (15,16,19,15,6,20,26)が 7 株 (46.7%)、ST926 (15,16,19,15,6,20,14)が 2 株 (13.3%)分離されていた。6B, 6A に比べ各ローカスの配列はよく保存され、1株を除き *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* の各配列は全ての分離株で同じであった。一方、このような株でも *ddl* の配列は 6 種類の多型性を示した。

PCG の MIC は ST236 が 1-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ST926 が 1-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 株だけであったが ST1464 (4,16,19,15,6,20,106)の菌は 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示した。

#### D. 考察

6B, 6A が様々なローカスの配列からなる ST で構成されているのに対し、19F は比較的均一な群であることが判明した。19F のペニシリン耐性と *ddl* の配列との関連性につき、今後の

解析が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

薬剤耐性菌等に関する研究班  
市中病院における多剤耐性結核患者管理体制の確立

研究分担者 京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学 一山 智

### 研究要旨

結核感染の診断には従来ツベルクリン反応が用いられてきたが、免疫不全患者での陽性率の低さやBCG接種患者における偽陽性など、わが国においては結核感染の診断はツ反では困難であった。QFT-2G（クオンティフェロン2G、以下QFT）は、結核特異抗原をリンパ球に反応させ結核を判定する新しい検査法であるが、結核ハイリスク群である免疫抗膠原病患者における有用性を検討した。

今年度は更に症例を追加し、全298症例について解析を行った。23例（7.7%）が判定不可と判定されたが、うちSLE患者が17例を占め、SLE患者においては17/63（27.0%）で判定不可となった。判定不可例では、判定可能例と比較して末梢血リンパ球数が有意に低値であり、SLEの活動性指標（SLEDAI）が有意に高かった。ツ反は判定した全例（14例）すべて陰性であった。結核発病患者での評価では、7例中5例でQFTが陽性（71.4%）となり、うち2例ではQFTは結核症の早期発見に有用であった。

以上より免疫抑制薬を投与されている膠原病患者においてもQFTはツ反と比較して結核感染および発病の診断において有用であると考えられたが、活動性の高いSLE患者では、活動性の低下をまって判定する必要があると考えられた。

### 研究協力者：

飯沼由嗣（京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学）

### A. 研究目的

今日ステロイドや免疫抑制剤の他あるいはTNF $\alpha$ 阻害剤をはじめとする生物学的製剤が導入され、難治性疾患の予後の改善に寄与してきているが、医原的な免疫抑制患者は増加している。このため、結核患者とりわけ多剤耐性結核患者の管理上、結核の感染伝播を正しく診断をすることは今後ますます重要となっている。

結核感染の診断には従来ツベルクリン反応が用いられてきたが、免疫不全患者での陽性率の低さやBCG接種患者における偽陽性など、わが国においては結核感染の診断はツ反では困難であった。QFT-2G（クオンティフェロン2G、以下QFT）は、結核特異抗原をリンパ球に反応させて、産生されるIFN- $\gamma$ を測定し、結核の感染を診断するものであり、結核患者での検討ではツ反よりも優れ

た感度を有しており、BCG接種患者では陽性にならないなど特異性も優れている。

免疫異常が疾患の基盤にあり、さらに免疫抑制療法を行っている膠原病患者（Connective Tissue Diseases：CTD）は、結核感染発病のハイリスクグループであり、特に重症リウマチ患者に使用される生物学的製剤であるTNF $\alpha$ 阻害剤（レミケード等）は結核発病のリスクを最大10倍にも上昇させる。これらの患者の結核感染を知る目的でQFTが実施されているが、免疫異常と免疫抑制療法による影響により判定が困難となる可能性がある。本年度は、更に症例を加え、解析を行うこととした。

### B. 研究方法

対象：京大病院免疫膠原病内科でフォロー中の膠原病患者のうち、QFTを実施したもの。

方法：対象患者にQFT検査およびツベルクリン反応を行い、QFT陽性例では、胸部CT、喀痰検査により結核感染あるいは発病の有無を確認した。さらに、判定不可の症例についてその臨床的背景

(治療内容、末梢血リンパ球数、SLEでは活動性指標であるSLEDAI等)の解析を行った。

### C. 研究結果

#### 1. QFTの結果

免疫膠原病内科でフォロー中の計298症例について検討を行った。SLEを除く膠原病患者における判定不可率は、RAでは3/96(3.1%)が判定不可であったのみであり、他の膠原病(PM/DM;n=32、vasculitis;n=26、SSc;n=12、Overlap syndrome;n=10、TA;n=10、SjS;n=8、Behcet;n=6、AOSD;n=5、MCTD;n=3、他;n=27)で判定不可例は3例のみであった(計:3/139、2.2%判定不可)。SLE患者では、63例中、陽性2例、判定保留2例、陰性42例、判定不可17例(27.0%)となった。合計では23/298例(7.7%)が判定不可となった。判定不可を除く19/275例(6.9%)がQFT陽性と判定された。

#### 2. 判定不可例の解析

次にSLEの判定不可例(n=17)について臨床背景の解析を行った。

##### 1) 臨床背景(表1)

QFT判定不可の17例は、M:F=3:14であり、平均年齢は32.9才(18-71才)、12例でステロイド治療が行われていた。Mitogen刺激が0.5未満で判定不可となったものが15例であり、このうち2例(Case1, 7)では、Control(刺激なし)でIFN $\gamma$ の異常高値を認めた。また2例(Case14, 15)では、Control(刺激なし)でのIFN $\gamma$ の異常高値が判定不可の原因となった。

##### 2) QFT判定可能例と不可能例の比較(表2)

ステロイド治療内容において、両群にあきらかな差は認めなかった。免疫抑制剤では、むしろQFT判定可能例で使用比率が高かった(不可:可能=12:28%,以下同)。ツ反はともにほぼ全例が陰性であり、アネルギーの状態と考えられた。末梢血リンパ球数は判定不可群において有意に低値となった(844:1280/ $\mu$ L)。SLE DAI(SLEの活動性指標)では、判定不可例が有意に高値をとった(14.4:8.5)。

##### 3. 結核発病例の検討(表3)

研究期間中7例の結核発病例が確認された。ただし、1例は不明熱の患者であり、結果的に膠原

表1 SLEの判定不可例(n=17)の臨床背景

Case	Age	Sex	Control	Mitogen	ESAT-6	GFP-10	PPD	Therapy	Lymphocyte	SLE DAI
									(/ $\mu$ L)	
1	27	F	5.5	0	0.47	0.26	-	Beta4mg	1,270	5
2	47	M	0.18	0.07	<0.05	<0.05	-	none	676	33
3	23	F	0.17	0.21	<0.05	<0.05	-	PSL25mg	1,910	8
4	41	F	0.04	0.28	<0.05	<0.05	-	PSL11mg	496	9
5	71	M	0.03	0.32	<0.05	<0.05	-	mPSL1000mg	288	6
6	58	F	0.27	0.34	<0.05	<0.05	-	PSL15mg	360	3
7	25	F	10	0.46	<0.05	0.51	-	PSL10mg	144	23
8	17	F	0.15	0.16	<0.05	<0.05	-	none	594	22
9	18	F	0.09	0	<0.05	<0.05	n.d.	PSL25mg	165	14
10	28	F	0.01	0.25	<0.05	<0.05	-	PSL50mg	2,390	20
11	24	F	0.44	0.04	<0.05	<0.05	-	PSL45mg	292	10
12	36	F	0.04	0.04	<0.05	<0.05	-	PSL30mg	1,740	26
13	39	F	0.02	0.36	<0.05	<0.05	n.d.	PSL5mg	536	0
14	18	F	2.4	1.19	<0.05	0.21	n.d.	none	752	5
15	19	F	1.28	5.96	<0.05	<0.05	-	none	792	18
16	35	F	0.09	0.31	<0.05	<0.05	-	none	1,512	22
17	34	M	0.06	0.21	0.09	0.16	-	PSL30mg+MZB	440	21

DAI: Disease Activity Index  
n.d.:未施行