

ESBL-SOP/Ver.3.0 2007/11/12

(3) PCR 法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子 (ESBL) の検出
1. 検体検体からの DNA 抽出
【手順】
1. 検体検体 (pH8.0) (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

2. PCR 検出手順
1. 検体検体の抽出 (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...
2. PCR 検出手順
【PCR 検出手順】
1. 検体検体の抽出 (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

検体検体 (pH8.0) (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...
2. PCR 検出手順
【PCR 検出手順】
1. 検体検体の抽出 (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

3. 電気泳動によるシグナル検出
【電気泳動によるシグナル検出】
1. 電気泳動によるシグナル検出
2. 電気泳動によるシグナル検出
3. 電気泳動によるシグナル検出

PCR 法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子 (ESBL) の検出
1. 検体検体からの DNA 抽出
【手順】
1. 検体検体 (pH8.0) (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

2. PCR 検出手順
【PCR 検出手順】
1. 検体検体の抽出 (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

【試薬、試液等】
1. PBS: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
2. PCR 検出試薬
3. 電気泳動試薬

3. 電気泳動によるシグナル検出
【電気泳動によるシグナル検出】
1. 電気泳動によるシグナル検出
2. 電気泳動によるシグナル検出
3. 電気泳動によるシグナル検出

(13) PCR 法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子 (ESBL) の検出
1. 検体検体からの DNA 抽出
【手順】
1. 検体検体 (pH8.0) (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

2. PCR 検出手順
【PCR 検出手順】
1. 検体検体の抽出 (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

検体検体 (pH8.0) (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...
2. PCR 検出手順
【PCR 検出手順】
1. 検体検体の抽出 (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

3. 電気泳動によるシグナル検出
【電気泳動によるシグナル検出】
1. 電気泳動によるシグナル検出
2. 電気泳動によるシグナル検出
3. 電気泳動によるシグナル検出

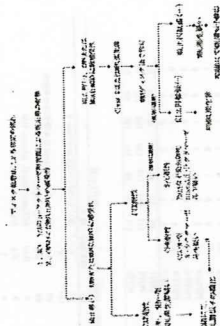
PCR 法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子 (ESBL) の検出
1. 検体検体からの DNA 抽出
【手順】
1. 検体検体 (pH8.0) (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

2. PCR 検出手順
【PCR 検出手順】
1. 検体検体の抽出 (例: 糞便、尿) 約 100µl を、1.5ml エピセントル...

【試薬、試液等】
1. PBS: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
2. PCR 検出試薬
3. 電気泳動試薬

3. 電気泳動によるシグナル検出
【電気泳動によるシグナル検出】
1. 電気泳動によるシグナル検出
2. 電気泳動によるシグナル検出
3. 電気泳動によるシグナル検出

【菌株鑑定子株までのフロー】



以上

VRE の分子疫学展開

【はじめに】
Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) は、腸管内の常在菌である Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Enterococcus gallinarum, Enterococcus faecium などに属する細菌で、抗生物質耐性が高い。...

【背景】
VRE は、抗生物質耐性が高い細菌であり、医療機関や介護施設などで感染拡大している。特に Enterococcus faecium は、VRE の主要な病原体として知られている。...

【結論】
VRE の分子疫学展開は、感染拡大のメカニズムを明らかにし、感染制御策の立案に役立つ。特に Enterococcus faecium の感染拡大は、医療機関や介護施設での感染拡大の主要な原因となっている。...

表1. テンドログラム解析による群別構築

Table with columns for clusters (A-F) and individuals (A-F). It shows the results of a dendrogram analysis used for population structure determination.

表2. PFGE解析結果-概観

Table showing PFGE analysis results for different clusters. It includes columns for cluster name, number of individuals, and other relevant data.

VRE の分子疫学展開

【はじめに】
VRE は、抗生物質耐性が高い細菌であり、医療機関や介護施設などで感染拡大している。特に Enterococcus faecium は、VRE の主要な病原体として知られている。...

【背景】
VRE の分子疫学展開は、感染拡大のメカニズムを明らかにし、感染制御策の立案に役立つ。特に Enterococcus faecium の感染拡大は、医療機関や介護施設での感染拡大の主要な原因となっている。...

【結論】
VRE の分子疫学展開は、感染拡大のメカニズムを明らかにし、感染制御策の立案に役立つ。特に Enterococcus faecium の感染拡大は、医療機関や介護施設での感染拡大の主要な原因となっている。...

POT による MISA の分子疫学解析

1. 背景
POT (Phage Origin Tag) は、噬菌体由来の DNA 配列であり、MISA (Molecular In Situ Analysis) と呼ばれる。...

2. 方法
POT による MISA の分子疫学解析は、まず DNA を抽出し、PCR で POT 領域を増幅する。その後、シーケンシングを行い、得られた配列をデータベースと比較する。...

3. 結果
POT による MISA の分子疫学解析の結果は、MISA の感染拡大のメカニズムを明らかにし、感染制御策の立案に役立つ。特に Enterococcus faecium の感染拡大は、医療機関や介護施設での感染拡大の主要な原因となっている。...

4. 結論
POT による MISA の分子疫学解析は、感染拡大のメカニズムを明らかにし、感染制御策の立案に役立つ。特に Enterococcus faecium の感染拡大は、医療機関や介護施設での感染拡大の主要な原因となっている。...

1. 試薬

- 1.1. プライマー (Primer)
1.1.1. プライマー (Primer)
1.1.2. プライマー (Primer)

- 1.2. 反応液 (Reaction mixture)
1.2.1. 反応液 (Reaction mixture)
1.2.2. 反応液 (Reaction mixture)

- 1.3. プライマー (Primer)
1.3.1. プライマー (Primer)
1.3.2. プライマー (Primer)

5.2. PCR 反応条件
1. 95°C 10 min
2. 95°C 30 sec
3. 55°C 30 sec
4. 72°C 5 min

10 mg/ml gentamicin bromide solution 10 µl (10 µg/ml, 調整済み)

1. 試薬

- 1.1. プライマー (Primer)
1.1.1. プライマー (Primer)
1.1.2. プライマー (Primer)

- 1.2. 反応液 (Reaction mixture)
1.2.1. 反応液 (Reaction mixture)
1.2.2. 反応液 (Reaction mixture)

- 1.3. プライマー (Primer)
1.3.1. プライマー (Primer)
1.3.2. プライマー (Primer)

平成 21 年 11 月 24 日

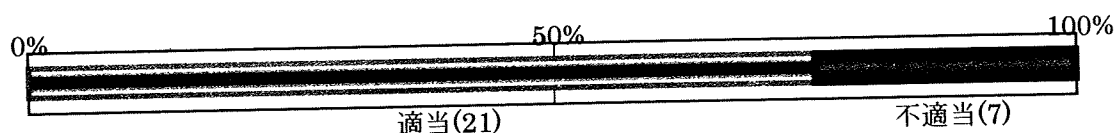
平成 21 年度

「薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会」参加者アンケートの結果

平成 21 年 10 月 30-31 日（金、土）に開催された「薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会」に参加された 28 名の方に、研修会最後に今回の研修についての感想を聞いたところ以下の通りであった。

1. 研修会全体について

①開催時期は適当でしたか？



研修会応募案内開始を 8 月、開催を 10 月下旬の金、土曜日の二日間と設定したことについて、参加のための旅費確保及び休日開催について意見を聞いた。開催場所としては、感染研の講義室、実習室を利用した。

以下、コメントを転記した。

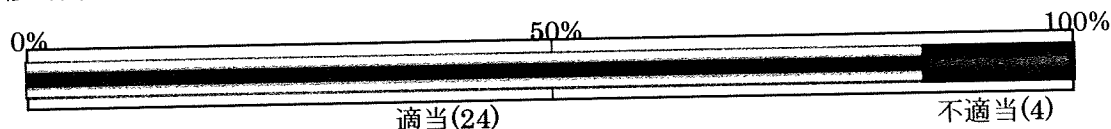
○適当であったと回答を頂いた方から

- ・開催時期は適応であったが、案内を早く頂ければ良かった。
- ・開始時間が 9 時では前泊が必要になるところが多いと思います。もう少しずらすとよいのではないかと思います。
- ・出来れば前年に研修場所、期間等アナウンスしていただけると旅費を予算に組み込みができるので助かる。

○不適当であったと回答を頂いた方から

- ・旅費の確保が困難（2）
- ・土曜日はやめてほしい（6）。
- ・学会等多忙な時期で、細菌担当スタッフが 2 名しかいない。

②研修時間は適当でしたか？



以下、コメントを転記した。

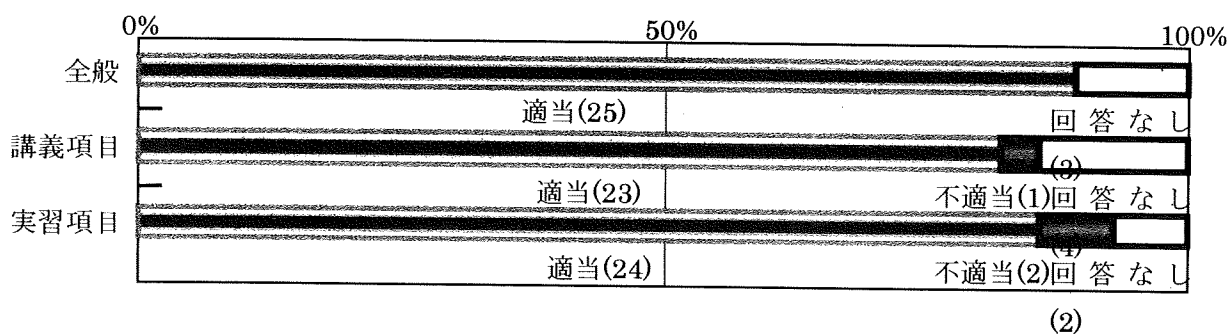
○適当であったという意見の方から

- ・3 日もあればさらに充実した内容になると思いますが、そうすると参加が困難になりますので、...
- ・内容的にはもう一日程度聞きたいです。開始時間を 12 時にして、もう一日のばすというはどうでしょうか？

○不適当であったという意見の方から

- ・3 日くらいがよい（4）
- ・少し短かった。結果の解釈や各班の結果など共有できると良かったと思う。

③研修項目は適当でしたか？



以下、コメントを転記した。

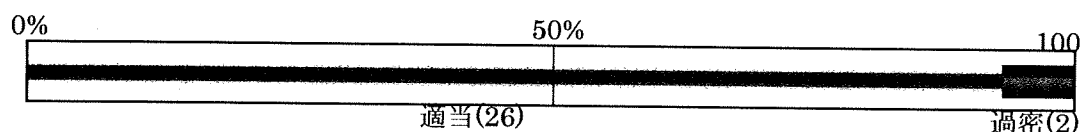
○講義項目について

- ・耐性菌耐性を獲得するメカニズム、医療関連感染症対策時の地研の役割、検査法について、もっと聞きたかった。しかし、耐性菌もいろいろな菌種があるので難しいと思いますが。
- ・食品からの分離も聞きたかった。
- ・各種耐性菌の検出頻度など背景の説明があればなお良かった。

○実習項目について

- ・菌の分離等の実習もあればよかった。
- ・PFGE も実施してほしい(2)。
- ・他のグループの POT 法の結果が気になりました。

④タイムスケジュールは適当でしたか？

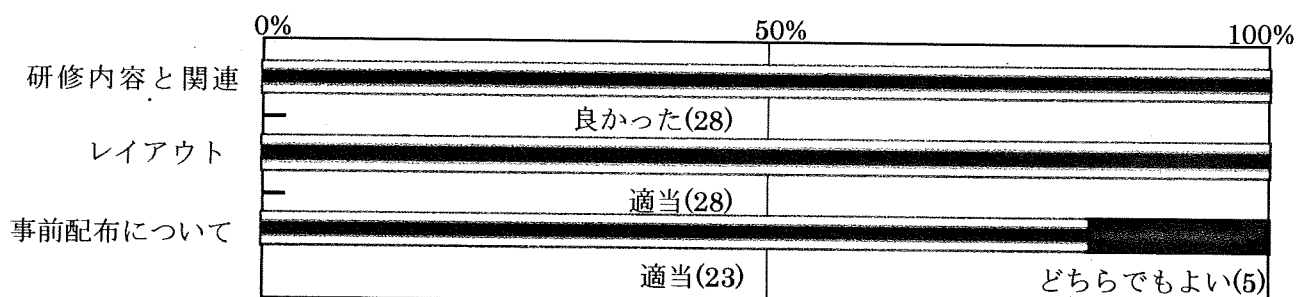


研修会のタイムスケジュールについては、概ねよい評価を頂いたと思っている。しかし、少し過密であるというご意見も頂きました。

以下に頂きました意見を転記する。

- ・少し過密すぎると思いましたが、事前にテキストを頂いたので予習すれば問題ないです。
- ・ピペット待ちがあったので、ピペットを持参して、待ち時間をなくするのは如何でしょう。
- ・2つの実習項目を並列で行っていたので、戸惑う人がいたかも知れません。

2. テキストについて



この設問では、研修会に使用した実習テキストについて設問した。その結果、研修内容と

の関連性、テキストのレイアウトについては、適切であり、良かったという回答であった。また、今回、研修内容について事前に配布（郵送）して、予め具体的な研修内容について把握できるようにしたが、そのことについても聞いたところ、その必要性について概ね、理解していただいていた。

3. 講義・実習についての感想

（実習については、試薬や器具等についても具体的な意見をお願いした）

- ・時間通りの進行で準備もすばらしかった。
- ・POT法のNo.2と4がテキストと違う結果になったので原因などを鈴木先生からのフォローがあればうれしい。
- ・フィルム、器具など待ちが最初とまどった。
- ・もう少し研修したかった 結果の解析や各班の結果を共有できるとよかった。
- ・個人単位で実習してみたい。10~20μチップを手ではずすのがいかがかと感じた。
- ・パルス手順の方法等、短縮できることが学習できてよかった。
- ・ピペットなど持参しては？
- ・ピペット不足、計算機の用意及び泳動槽が班にもう一つほしかった。
- ・事前テキストのおかげで予習ができ内容が把握できた。
- ・実習のフロー図のようなものがあれば良かった。
- ・菌液調整、POT法の計算なども勉強したかった。
- ・調整済の試薬等についての詳細なコメントがほしい。
- ・POT法でエキストラバンドが出現する株で実習してみたかった。
- ・PFGEも菌種によつての、コツを知りたい。

4. 感想（自由記載を依頼）

- ・先生が地研の方なので質問しやすかった。
- ・テクニックの差が出やすいPFGEも研修したい。
- ・POT法は、絶妙のマルチプレックスです。POT1でMRSAのクローンが判断できるのは便利。
- ・病院の検査室から相談されたとき今回の研修を活かしたい。
- ・情報交換できてよかったです。ありがとうございました。
- ・ハイレベルな所とそうでないところ二極化していると感じた。
- ・全国で散発発生し分離された耐性菌について、代表的な地研で解析したものをディスカッションしてみたい。
- ・薬剤耐性はこれから重要になると思われるのでネットワーク作りをお願いしたい。感染症と食品の分担があるようだが統一してみたい何かいい案がありましたらお願いしたい。
- ・行政側へのアプローチがよくわからない。
- ・地研と病院がお互いを理解しながらどう関わっていくか今後の課題だと思った。なかなか接点がないので他の自治体でどうしてるか知りたい。
- ・日程として土曜日は辞めてほしい（複数人）。
- ・研修開始が午前9時からなので前泊が必要となってしまいます。もう少し遅くしてほしい。
- ・感染研までのわかりやすい地図がほしかった（場所がわかりにくい）。
- ・大変勉強になりました。ありがとうございました。
- ・今後の業務の参考とします（多数）。

以上。

カルバペネム耐性菌をはじめとする新型の薬剤耐性菌の構造・機能解析と
立体構造に立脚した蛍光剤の分子設計並びに迅速・簡易検査法の確立

研究分担者 黒崎 博雅

（熊本大学大学院生命科学研究部構造機能物理化学分野）

研究要旨

本研究では、臨床の現場で簡便、迅速に1個のメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌をリアルタイムに検出・診断および定量する方法の開発を目指し、蛍光剤(DansylC4SH)のメタロ-β-ラクタマーゼ(IMP-1, VIM-2, IND-7)への取り込み速度とメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の蛍光検出に関する研究を行った。DansylC4SHとIMP-1、VIM-2、IND-7の取り込み速度を蛍光ストップフロー法により検討した結果、IMP-1が最も速く、IMP-1と比べてVIM-2が0.65倍、IND-7が0.05倍となった。さらにIMP-1産生菌並びにIMP-1非産生菌をDansylC4SHで染色後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡下で観察したところIMP-1産生菌の方が非産生菌に比べ強く光ることがわかった。以上の事より、DansylC4SHは一個のメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を高感度かつ定量的に捉えることが可能であり、迅速、簡便に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

松田幸喜 熊本大学大学院薬学教育部
博士前期課程2年

A. 研究目的

β-ラクタマーゼはβ-ラクタム剤のβ-ラクタム環を加水分解しβ-ラクタム剤の抗菌活性を消失させる酵素である。β-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β-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β-ラクタマーゼは活性中心に亜鉛(II)を有しており“メタロ-β-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。

本研究では、医療施設で問題となっているカルバペネム系β-ラクタム剤をも分解し不活化するMBL産生菌をその場で簡便・迅速に菌を培養することなく菌体のままでリアルタイム検出・診断及び定量できる蛍光検出法の開発を目的としている。本研究での蛍光検出法の概略図をFig.1示す。我々が開発した蛍光剤N-[2-(5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonylamino)butyl]-3-mercaptopropionamide(DansylC4SHと略す、Fig.2)がグラム陰性菌の外膜通過後ペリプラズム間隙に到達すると標的酵素であるMBLに特異的に結合することで強い蛍光を発する。そしてその発光をフローサイトメトリー法等で捉えリアルタイムでMBL産生菌の検出を行うというものである。この蛍光発光原理を利用しているため、グラム陰性菌の菌種に関係なく一個のMBL産生菌を高感度かつ定量的に捉えることが可能である。一方、MBL非産生菌ではMBL産生菌で観察される強い発光現象は観測されないことからMBL産生菌と非産生菌の判別が可能であると考え

る。そのため、本研究では研究目的を達成するために2つのサブテーマを設定し研究を行った。

1. MBL (IMP-1, VIM-2, IND-7) の DansylC4SH の取り込み速度の測定：IMP-1, VIM-2, IND-7 の精製酵素溶液と DansylC4SH 溶液を混合し、その時の取り込み速度を蛍光ストップフロー法により測定した。その結果から、活性中心付近の比較により構造学的な考察を行った。
2. MBL 産生菌の蛍光検出：集菌や破碎をすることなく IMP-1 産生菌を検出することを目指して、染色条件の検討並びに共焦点蛍光顕微鏡による観察を行った。

B. 研究方法

本研究で用いた蛍光剤 DansylC4SH の合成

既に我々が報告した方法に従って合成した。

Serratia marcescens 由来メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の調製と精製

Escherichia coli XL-1 Blue (pET9a/IMP-1) 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/IMP-1) から抽出したプラスミド 50 μL と competent cell (*E. coli* BL21 (DE3)) 100 μL 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 °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 °C に保っておいた SOC 培地を 900 μL 加え、37 °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 μg/mL カナマイシンを含む 10 mL LB 液体培地に植菌し、37 °C で一晩振とう培養 (150 rpm) した。一晩培養した培養液を、50 μg/mL カナマイシンを含む 2 L LB 液体培地に 10 mL 植菌し、37 °C で振とう培養 (150 rpm) した。5 時間後、分光光度計により OD₆₀₀ が 1.0 付近であることを確認後、培養液中濃度が 0.5 mM となるように IPTG を添加し、37 °C で振とう培養 (100 rpm) した。一晩培養後、培養液を回収し、4 °C で 30 分間遠心 (5,000×g) し、菌体を集めた。これを 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 30 mL で懸濁し、4 °C で 30 分間遠心 (5,000×g) し、湿菌重量で約 8.6 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 Tris-HCl (pH 7.4) で菌体を再懸濁させ、氷浴中で 25 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 °C で 30 分間遠心 (30,000×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™ High Performance (φ16 mm × 3 cm、流速 1 mL/min) を使い、粗酵素溶液を乗せ 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) で NaCl 濃度 (0-0.5 M) によって塩勾配をかけ、溶出させ 5 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 Ultra-15 で約 500 μL に濃縮した。濃縮した活性分画を Hiload™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade (φ1.6 cm × 60 cm、流速 0.5 mL/min) を使い、酵素液を 2 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 °C で保存した。

IMP-1 の定量

IMP-1 の濃度は分光光度法により求めた。すなわち、IMP-1 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 $\epsilon_{280} = 49,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とし、IMP-1 溶液の 280 nm における吸光度から濃度を算出した。

メタロ-β-ラクタマーゼ (VIM-2) の調製と精製
E. coli XL-1 Blue (pColdIV/VIM-2) 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 (pColdIV/VIM-2) から抽出したプラスミド 50 μL と competent cell (*E. coli* BL21 (DE3)) 100 μL 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 °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 °C に保っておいた SOC 培地を 900 μL 加え、37 °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 μg/mL アンピシリンを含む 10 mL LB 液体培地に植菌し、37 °C で一晩振とう培養 (150 rpm) した。20 時間培養した培養液を、50 μg/mL カナマイシンを含む 8 L LB 液体培地に 10 mL 植菌し、37 °C で振とう培養 (150 rpm) した。5 時間後、OD₆₀₀ が 0.5 付

近であることを確認後、培養液中濃度が 0.1 mM となるように IPTG を添加し、37 °C で振とう培養 (100 rpm) した。一晚培養後、培養液を回収し、4 °C で 30 分間遠心 (5,000×g) し、菌体を集めた。これを 20 mM BisTris-HCl (pH 6.5) 30 mL で懸濁し、4 °C で 30 分間遠心 (5,000×g) し、湿菌重量で約 26.1 g の菌体を得た。湿菌重量 1 g に対して 1 mL の割合で 20 mM BisTris-HCl (pH 6.5) で菌体を再懸濁させ、氷浴中で 25 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 4 °C で 30 分間遠心 (30,000×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 Q-Sepharose™ High Performance (ϕ 16 mm × 3 cm、流速 1 mL/min) を使い、粗酵素溶液を乗せ 20 mM BisTris-HCl (pH 6.5) で NaCl 濃度 (0-0.3M) によって塩勾配をかけ、溶出させ 5 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。次に、活性分画を Hiload™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade (ϕ 1.6 cm × 60 cm、流速 0.5 mL/min) を使い、酵素溶液を乗せ 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 0.3M NaCl で溶出させ 280 nm の吸光度を測定しピークがある分画を分取した。HiTrap™ phenyl HP (ϕ 16 mm × 3 cm、流速 1 mL/min) を使い、酵素溶液を乗せ 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) で (NH₄)₂SO₄ 濃度 (1.5-0 M) によって勾配をかけ、溶出させ 5 mL ずつ分取し 280 nm の吸光度を測定しピークがある分画を分取した。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-PAGE 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 °C で保存した。

VIM-2 の定量

VIM-2 の濃度は分光光度法により求めた。すなわち、VIM-2 のモル吸光係数を CBB 法で VIM-2 のモル吸光係数を元に補正し $\epsilon_{280} = 32,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とし、VIM-2 溶液の 280nm における吸光度から濃度を算出した。

メタロ- β -ラクタマーゼ (IND-7) の発現及び精製

E. coli XL-1 Blue (pET29a/IND-7) からのプラスミド抽出、発現及び精製

既に報告されている方法に従って抽出、精製した。その方法を以下に示す。

(1) プラスミド抽出、発現

E. coli XL-1 Blue (pET29a/IND-7) から抽出したプラスミド 50 μ L と competent cell (*E. coli* BL21(DE3)) 100 μ L を、マイクロチューブ (1.5 mL) 中で静かに攪拌した後、氷上に 30 分間放置した。42 °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 °C に保っておいた SOC 培地を 900 μ L 加え、37 °C、2 時間で振とう攪拌した。

(2) 培養

振とう攪拌後の液を 50 μ g/mL カナマイシンを含む 10 mL LB 液体培地に植菌し、37°C で一晚振とう培養 (150 rpm) した。一晚培養した培養液を、50 μ g/mL カナマイシンを含む 8 L LB 液体培地に 10mL 植菌し、37 °C で振とう培養 (150 rpm) した。5 時間後、OD₆₀₀ が、1.0 付近であることを確認後、培養液中濃度が 0.1 mM となるように IPTG を添加し、37 °C で振とう培養 (100 rpm) した。一晚培養後、培養液を回収し、4 °C で 30 分間遠心 (5,000×g) し、菌体を集めた。これを 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 30 mL で懸濁し、4 °C で 30 分間遠心 (5,000×g) し、湿菌重量で約 10 g の菌体を得た。湿菌重量 1 g に対して 1 mL の割合で 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) で菌体を再懸濁させ、氷浴中で 25 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 4 °C で 30 分間遠心 (30,000×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™ High Performance (ϕ 16 mm × 3 cm、流速 1 mL/min) を使い、粗酵素溶液を乗せ 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) で NaCl 濃度 (0-0.5M) によって塩勾配をかけ、溶出させ 5 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。次に、活性分画を Hiload™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade (ϕ 1.6 cm × 60 cm、流速 0.5 mL/min) を使い、酵素溶液を乗せ 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 0.3M NaCl で溶出させ 280 nm の吸光度を測定しピークがある分画を分取した。HiTrap™ phenyl HP (ϕ 16mm×3cm、流速 1 mL/min) を

使い、酵素溶液を乗せ 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) で $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度 (1.5-0 M) によって勾配をかけ、溶出させ 5 mL ずつ分取した。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-PAGE 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°C で保存した。

IND-7 の定量

IND-7 の濃度は分光光度法により求めた。すなわち、IND-7 のモル吸光係数を CBB 法で IND-7 のモル吸光係数を元に補正し $\epsilon_{280} = 34,280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とし、IND-7 溶液の 280 nm における吸収光度から濃度を算出した。

IMP-1、VIM-2、IND-7 の DansylC4SH に対する取り込み速度の測定

DansylC4SH の 3 種類の MBL (IMP-1、VIM-2、ならびに IND-7) への取り込み速度をストップフロー法を用いて検討した。25 $^\circ\text{C}$ 、励起波長 340 nm、測定波長 535nm、cutoff フィルター $< 400 \text{ nm}$ 以下としてメタノール 6 % を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5M NaCl) を用いて行った。5 μM の酵素溶液に DansylC4SH 濃度が 5 μM -30 μM になるように高速で混合し、時間変化における 535 nm の蛍光強度の変化を測定した。MBL と DansylC4SH との反応を擬一次反応とし、測定データを式 (1) で定義された single exponential function にあてはめ、みかけの一次反応速度定数を求めた。

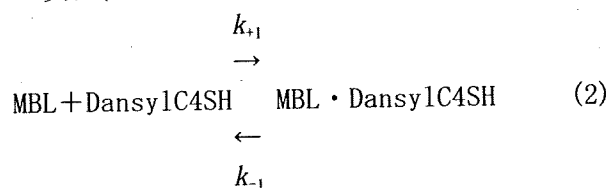
時間変化による蛍光強度変化は次式で表わされる。

$$F(t) = \Delta F \exp(-k_{\text{obs}}t) + F_{\infty} \quad (1)$$

ここで、

$F(t)$: 蛍光強度変化、 ΔF : 蛍光強度の振幅、 F_{∞} : 蛍光強度の最終値、 k_{obs} : みかけの一次反応速度定数と定義する。

次に、



の関係が成り立つことが分かった。

ここで、

MBL: IMP-1、VIM-2、または IND-7、DansylC4SH: 今回使用した蛍光剤、MBL \cdot DansylC4SH: 酵素-蛍光剤の複合体、 k_{+1} : 取り込み速度定数、 k_{-1} : 解離速度定数と定義する。

さらに、DansylC4SH の初濃度が酵素濃度に比べ高い時、擬一次速度定数 k_{obs} は

$$k_{\text{obs}} = k_{+1}[\text{DansylC4SH}] + k_{-1} \quad (3)$$

で表すことができる。 k_{+1} と k_{-1} の値は [DansylC4SH] vs k_{obs} のプロットの傾きと切片からそれぞれ得られる。MBL、DansylC4SH 複合体の解離定数 K_D は

$$K_D = k_{-1}/k_{+1} \quad (4)$$

から計算できる。

顕微鏡観察用の菌体懸濁液の調製

E. coli JM109 (pKF19k/IMP-1) 菌体懸濁液調製

E. coli JM109 (pKF19k/IMP-1) 菌株を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む LB 寒天培地にストリークし、37 $^\circ\text{C}$ で一晚培養した。形成した菌の白色コロニーから菌体を釣菌し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む 10 mL の LB 培地中 37 $^\circ\text{C}$ で振とう培養 (150 rpm) した。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む 500 mL の LB 培地に培養液を接種し、37 $^\circ\text{C}$ で OD_{600} が 3.0 になるまで一晚振とう培養 (120 rpm) した。培養液を回収し、湿菌重量 1 g に対して 1 mL の割合になるように 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) を加えて再懸濁した。

E. coli JM109 (pKF19k) 菌体懸濁液調製

E. coli JM109 (pKF19k)、菌株を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む LB 寒天培地にストリークし、37 $^\circ\text{C}$ で一晚培養した。形成した菌の白色コロニーから菌体を釣菌し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む 10 mL の LB 培地中 37 $^\circ\text{C}$ で振とう培養 (150rpm) した。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含む 500 mL の LB 培地に培養液を接種し、37 $^\circ\text{C}$ で OD_{600} が 3.0 になるまで振とう培養 (120 rpm) した。培養液を回収し、湿菌重量 1 g に対して 1 mL の割合になるように 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を加えて再懸濁した溶液を菌液とした。

共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた DansylC4SH のメタロ- β -ラクタマーゼ (IMP-1) 産生菌の検出

集菌した *E. coli* JM109 (pKF19k、pKF19k/IMP-1)、*E. coli* BL21(DE3) (pET9a、pET9a/IMP-1) の懸濁液を菌液とし、50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 890 μL 、菌液 10 μL 、メタノール 100 μL 、DansylC4SH 1 μM を混合した溶液を 30 分インキュベートし、2 μL をスライドガラスの上にのせ、乾燥しないようにカバ

ーガラスをマニキュアで封入したサンプルを蛍光顕微鏡で観察し、蛍光強度の違いを調べた。顕微鏡は Olympus FV10i-W、レーザ波長は 405 nm、対物レンズは 60×を用いて 観察を行った。

C. 研究結果と考察

IMP-1、VIM-2、IND-7 の DansylC4SH に対する取り込み速度の測定

IMP-1 は VIM-2、IND-7 とのアミノ酸配列相同性はどちらも 32%である。VIM-2 は IMP-1、IND-7 とのアミノ酸配列相同性はそれぞれ 32%と 37%である。本研究では DansylC4SH の 3 種類の MBL (IMP-1、VIM-2、ならびに IND-7) への取り込み速度をストップフロー法を用いて検討した。MBL と DansylC4SH との反応を擬一次反応とし、測定データを式(1)で定義された single exponential function にあてはめ、擬一次反応速度定数を求めた (Figs. 3-5)。

DansylC4SH と IMP-1、VIM-2 ならびに IND-7 との反応は濃度を高くするほど速度が大きくなっているのが観察できた。蛍光剤と MBL の反応では等モルでは蛍光強度が急激に増大し、それ以降は次第に平衡に達し、飽和する現象が観測され、DansylC4SH の濃度が増加するたび反応終了時間は短くなった。例えば IMP-1 は濃度が増加するたび反応終了時間は短くなり、30 μM では約 0.1 秒で反応が終了した。反応速度解析では得られた実験データを式(1)にあてはめ、非線形最小二乗法によりみかけの一次反応速度定数を算出した。

次に DansylC4SH 濃度と各濃度におけるみかけの一次反応速度定数をプロットし (Fig. 6)、式(2)と式(3)で定義される k_{+1} 、 k_{-1} を求めた。DansylC4SH の IMP-1、VIM-2 ならびに IND-7 への取り込み速度定数 k_{+1} と解離速度定数 k_{-1} は、IMP-1 では $0.863 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と 0.057s^{-1} 、VIM-2 は $0.714 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と 0.42s^{-1} 、IND-7 は $0.06 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と 0.085s^{-1} である (Table 1)。これより、IMP-1 と VIM-2 の取り込み速度定数は IND-7 の速度定数に比べ、14.4 倍、11.9 倍となり、DansylC4SH の IND-7 への取り込み速度定数は他の二つと比べてかなり遅いことが分かった。一方、IMP-1 と VIM-2 の解離速度定数は IND-7 の速度定数に比べ、0.67 倍、4.94 倍となった。取り込み速度定数 k_{+1} と解離速度定数 k_{-1} から、式(4)で定義される解離定数 K_0 は IMP-1 では $0.066 \mu\text{M}$ 、VIM-2 では $0.58 \mu\text{M}$ 、IND-7 では 1.4

μM となり、DansylC4SH は IMP-1>VIM-2>IND-7 の順に結合しやすいことが分かった (Table 1)。

この原因として考えられるのは、それぞれの酵素の活性中心の構造の違いが挙げられる。IMP-1 に 64 位の Trp を含むアンチパラレル β シート上の 58-67 位のアミノ酸残基から構成されるフラップがありフレキシブルで基質や阻害剤が結合する際に重要と考えられている。基質や阻害剤が結合していないときの IMP-1 の 3 次元構造を見ると (Fig. 7)、64 位の Trp のインドール環は活性中心から外れた向きになっている。一方、我々が解析した IMP-1-DansylC4SH 複合体の構造では、DansylC4SH が IMP-1 に結合すると、Trp のインドール環は活性中心の方へ大きく向きが変わり、DansylC4SH のダンシル基と edge-to-face で相互作用しているのが分かる。DansylC4SH のダンシル基とチオール基の間のスペーサー部は IMP-1 のアミノ酸残基のいずれとも相互作用しておらず、2つの構造のいずれかをとっているオルタネートの状態になっていることが分かっている。

以上に示すように、64 位の Trp の存在は非常に重要な存在であると考えられている。しかしこれに対して VIM-2 と IND-7 の 64 位はそれぞれ Ala と Lys である (Fig. 8)。そのため 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。さらに IND-7 に関しては loop1 の長さが 2 残基しかなく、loop1 における相互作用はさらに少ないと考えられる。さらに Loop2 領域に位置する 233 位の Asn が Tyr と異なっている (Fig. 8)。Tyr は Asn よりもかさ高いことから活性部位の空間を狭くすることで蛍光剤との結合に影響を与えていると考えられる。もう一つの理由として活性中心付近の構造の違いが挙げられる。以下に IMP-1、VIM-2 と IND-7 の活性中心の表面構造を示す (Fig. 9)。IMP-1 と VIM-2 はほぼ同じ幅の溝を活性中心に持つ。しかし、それに比べて IND-7 はかなり狭くなっていることが確認でき、結合するための溝がかなり狭くなっていることが分かった。これらの違いによっても結合のしやすさが異なることが示唆された。これらの MBL の中では、IMP-1 の持つ活性中心の溝が DansylC4SH には最も結合しやすいことが分かる。IMP-1、VIM-2、IND-7 と DansylC4SH

の解離定数を比べてみても、IMP-1 が最も小さく、IND-7 が最も大きい。

以上のことから、DansylC4SH は三種の MBL では IMP-1 と最も結合しやすい構造であることが確認できた。

共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた DansylC4SH のメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) 産生菌の蛍光検出

E. coli JM109 (pKF19k/IMP-1) と *E. coli* JM109 (pKF19k) を 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)-10% methanol 1 μM DansylC4SH で 30 分間染色し、Olympus FV10i-W により観察した結果を Fig. 10 に示す。共焦点レーザー顕微鏡による観察の結果、IMP-1 産生菌と非産生菌には、明瞭に蛍光強度の差が見て取れた。IMP-1 産生する大腸菌は IMP-1 非産生の大腸菌を蛍光強度の差で判別できると思われる。従って、Fig. 1 で示した DansylC4SH の MBL における蛍光発光の原理に基づいた MBL 産生菌の蛍光検出法の有用性を示したと考えられる。

D. 総括

本研究では DansylC4SH が MBL と反応すると蛍光強度が増大するという発光原理を利用して MBL 産生菌を培養することなく迅速かつリアルタイムに検出できる蛍光検出法の開発を行った。DansylC4SH と IMP-1、VIM-2、IND-7 の取り込み速度を蛍光ストップフロー法により求めた。その結果 IMP-1 が最も速く、IMP-1 と比べて VIM-2 が 0.65 倍、IND-7 が 0.05 倍と

なり、IND-7 は大きく差がついた。その理由として、基質ならびに阻害剤の結合認識と結合に重要なループ 1 の 1 つのアミノ酸が Trp、Ala、Lys と異なり、この部位の変異によるループ可動性が変化したことが要因に挙げられる。そして、我々が決定した IMP-1-DansylC4SH 複合体ならびに IND-7 の X 線結晶構造の比較から、活性ポケットの広さが IMP-1 に比べ IND-7 は狭まっていることが分かった。この溝の大きさの違いも取り込み速度に影響を与えていることが示された。

共焦点レーザー蛍光顕微鏡でも IMP-1 産生菌と IMP-1 非産生菌に蛍光強度に差があることが示された。

以上の事より、DansylC4SH は菌が産生する MBL と結合し、蛍光強度が上昇することが蛍光顕微鏡、により示され、MBL 産生菌を迅速、簡便に検出することが期待される。

E. 研究発表

薬剤耐性菌が産生するメタロ-β-ラクタマーゼの蛍光検出法の開発：ダンシル基とチオール基をもつ蛍光剤のメタロ-β-ラクタマーゼ IMP-1、VIM-2、IND-7 に対する蛍光特性。松田幸喜、山口佳宏、廣瀬順三、荒川宜親、黒崎博雅。第 38 回薬剤耐性菌研究会、群馬県伊香保温泉、2009 年 1 1 月。

F. 知的所有権の取得状況

該当なし

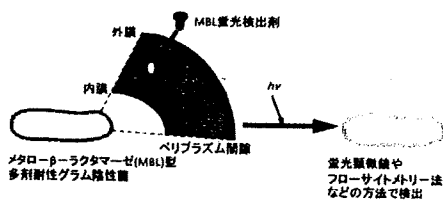


Fig. 1. Detection of MBL-producing bacteria by fluorescent reagent.

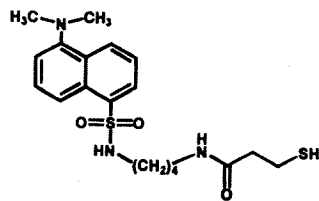


Fig. 2. *N*-[2-(5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonylamino)butyl]-3-mercaptopropionamide (DansylC4SH)

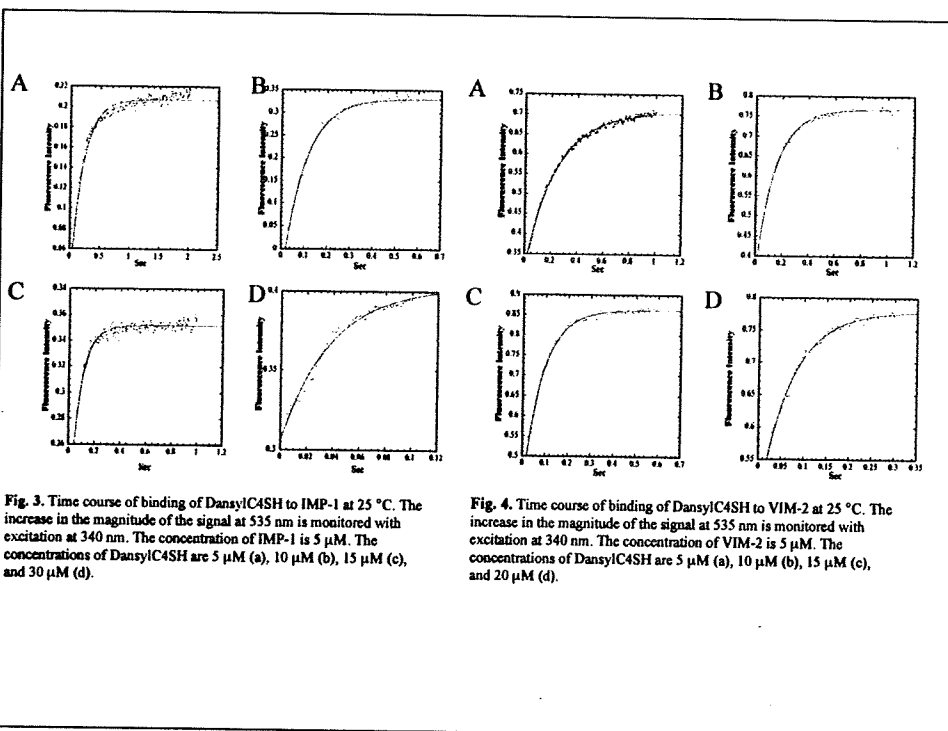
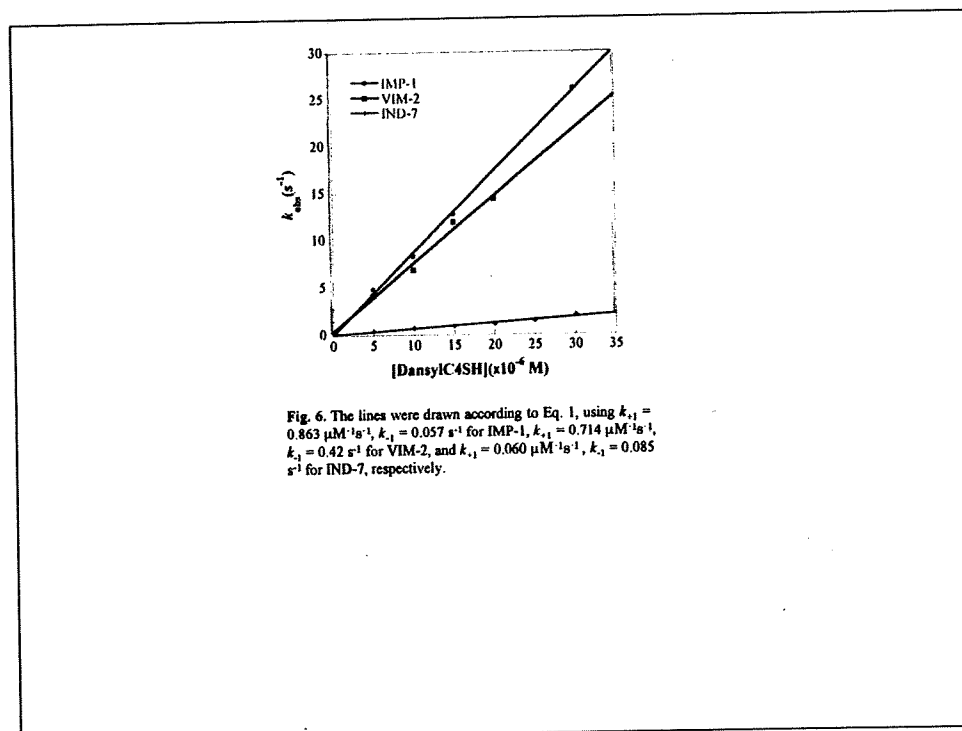
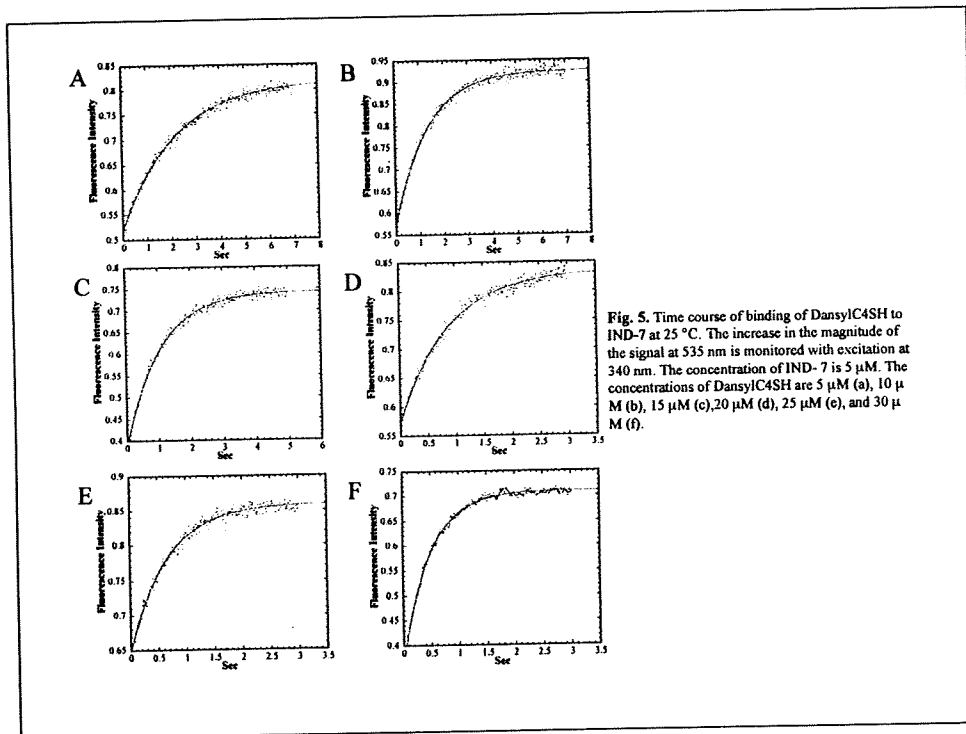


Fig. 3. Time course of binding of DansylC4SH to IMP-1 at 25 °C. The increase in the magnitude of the signal at 535 nm is monitored with excitation at 340 nm. The concentration of IMP-1 is 5 μM. The concentrations of DansylC4SH are 5 μM (a), 10 μM (b), 15 μM (c), and 30 μM (d).

Fig. 4. Time course of binding of DansylC4SH to VIM-2 at 25 °C. The increase in the magnitude of the signal at 535 nm is monitored with excitation at 340 nm. The concentration of VIM-2 is 5 μM. The concentrations of DansylC4SH are 5 μM (a), 10 μM (b), 15 μM (c), and 20 μM (d).



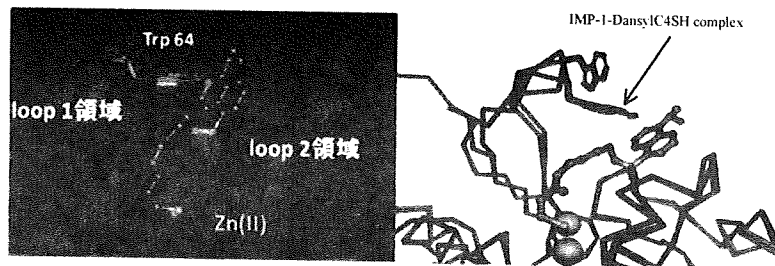


Fig. 7. Molecular surface representation of the IMP-1-DansylC4SH complex in the vicinity of the active site (left). Conformational change upon DansylC4SH binding (right). Superposition of the native, unbound IMP-1 structure and the DansylC4SH complex.

	$\beta 3$	Loop 1	$\beta 4$	Loop 2
		64		233
IMP-1:	--E E V N G W G V V PL	--G	H L G D A--
VIM-2:	--Q S F D G A - Y Y PT	S A G	H V A D A--
IND-7:	--G V F G G K - E A ST	D L G	I K E A--

Fig. 8. Comparison of the loops 1 and 2 of IMP-1, VIM-2, and IND-7

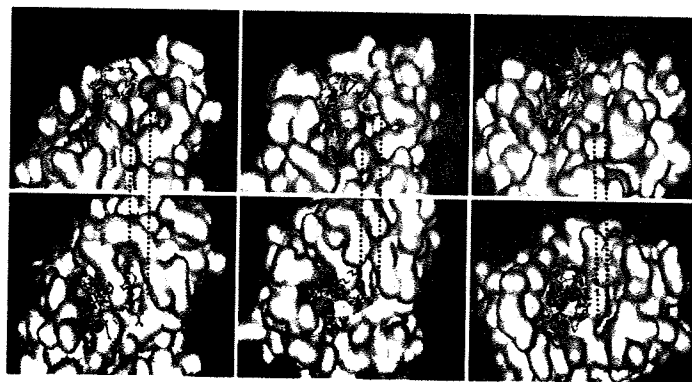


Fig. 9. Surface representation of IMP-1 (left), VIM-2 (middle), and IND-7 (right). The structures are graphically depicted with the viewpoint looking down the catalytic pocket (upper panels) or rotated from this view (lower panels).

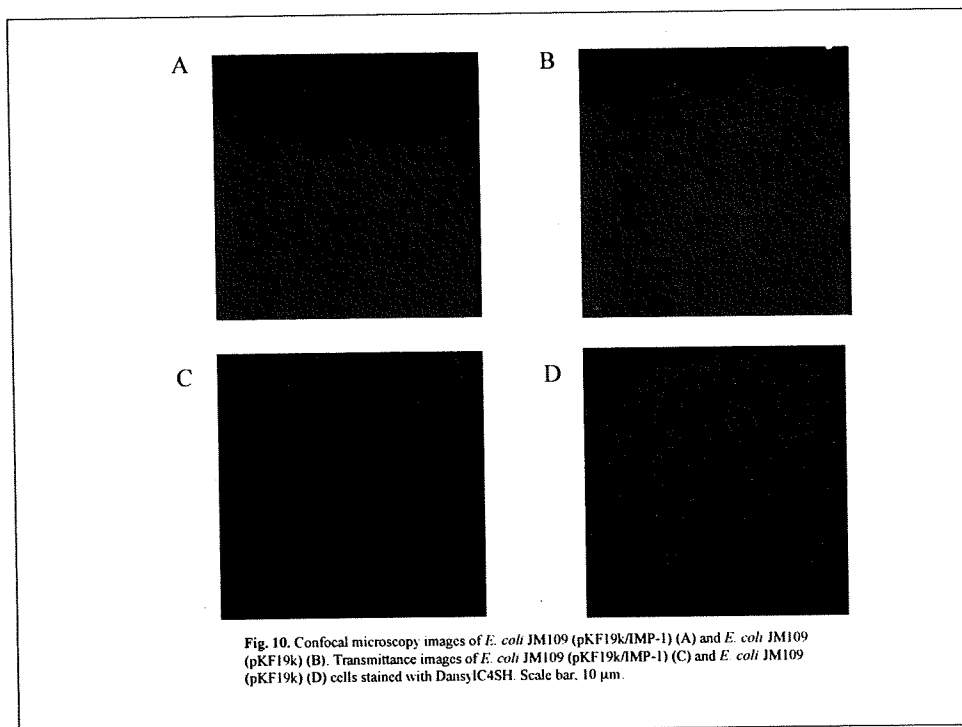


Fig. 10. Confocal microscopy images of *E. coli* JM109 (pKF19k/IMP-1) (A) and *E. coli* JM109 (pKF19k) (B). Transmittance images of *E. coli* JM109 (pKF19k/IMP-1) (C) and *E. coli* JM109 (pKF19k) (D) cells stained with DansylC4SH. Scale bar, 10 μm .

Table 1. Transient-phase kinetic parameters for the formation and decay of DansylC4SH-MBL complexes.

MBL	k_{-1} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_1 (s^{-1})	K_D (μM)
IMP-1	0.863	0.057	0.066
VIM-2	0.714	0.42	0.58
IND-7	0.06	0.085	1.4

新型薬剤耐性菌等に関する研究

結核菌におけるピラジナミド作用メカニズムの研究

研究分担者 柴山恵吾 （国立感染症研究所細菌第二部）

研究要旨

本研究では、結核菌におけるピラジナミド作用メカニズムの解明を目的とした。今年度は結核菌においてニコチン酸を基質とする酵素ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼに着目し、この酵素とピラジナミドの作用メカニズムとの関連について調べた。大腸菌を用いてリコンビナントのニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼを作成し、酵素学的な解析を行った。そしてこの酵素がピラジナミドの活性型であるピラジン酸存在下で ATPase 活性を示すことが分かった。この結果からピラジナミドの作用機構として、ピラジン酸の存在によって菌体内の ATP の消費が充進されることが関与している可能性が示唆された。次年度から、結核菌においてこの酵素の欠損株を作成してピラジナミド感受性の変化を解析する等、より詳細にこの酵素の関与について解析を進めるとともに他の酵素についても解析を進める予定である。ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼについて、ピラジナミドの作用機構への関与が有意であることが証明出来れば、さらにこの蛋白の結晶化、構造解析を進める。他の酵素についても同様に構造解析を進める。これらにより、新たなドラッグターゲットとしての分子の構造を解明して、新規抗結核薬の開発に貢献する事が期待できる。

研究協力者

森 茂太郎 （国立感染症研究所・細菌第二部）
和知野純一 （同上）
加地 千春 （同上）

A. 研究目的

ピラジナミドはニコチンアミドのアナログ物質で、結核菌の菌体内でピラジナミダーゼ(ニコチンアミダーゼ)の作用によって加水分解され、活性型のピラジン酸となり抗菌作用を発揮する。ピラジナミドに耐性を示す結核菌では、ピラジナミダーゼをコードする遺伝子に変異があってピラジナミダーゼ活性が失われ、ピラジナミドがピラジン酸に変換されないことが報告されている。ここで、ピラジナミドはピラジン酸に変換された後にどのような機構で抗菌活性を発揮するのかについては不明な点が多い。本研究では、結核菌におけるピラジナミドの作用メカニズムを明らかにすることを目的として、結核菌内でピラジナミドやピラジン酸の代謝に関わっていることが予想される酵素について、その機能の解析を進めている。ピラジン酸はニコチン酸のアナログであるため、今年度は結核菌においてニコチン酸を基質とする酵素ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼに着目し、酵素学的な解析を進めた。

B. 研究方法

結核菌のニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 Rv1330c をクローニングして蛋白を大腸菌で大量発現させた。Ni カラム、ゲル濾過カラムで蛋白を SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製した(図 1)。

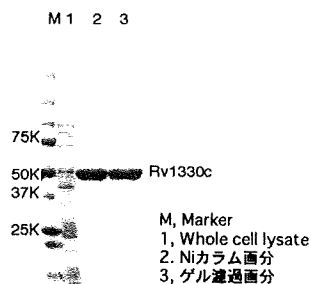


図 1. 蛋白の精製

得られた蛋白を用いて酵素学的解析を行った。基質として、ニコチン酸、ピラジン酸、ATP を用いた。酵素活性は、反応産物を HPLC で定量することにより測った。

倫理面への配慮

該当なし。

C. 研究結果

この蛋白は、ゲノムデータベースの annotation の通りニコチン酸を基質としてニコチン酸モノヌクレオチドを合成する酵素活性（ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ活性）が認められた。また、この酵素は、ATP を ADP に変換する ATPase 活性も併せ持つことが分かった(図 2)。

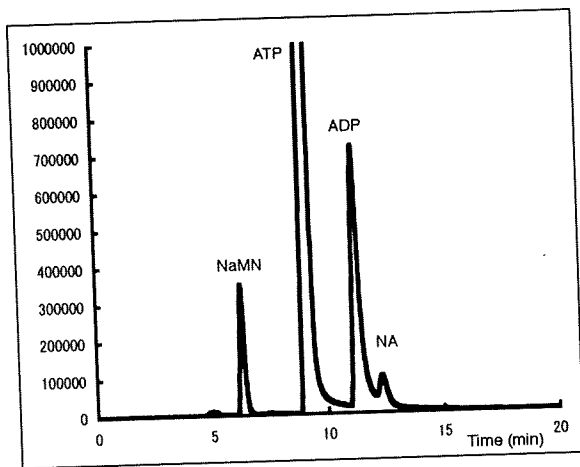


図 2. 精製酵素によるニコチン酸(NA)のニコチン酸モノヌクレオチド(NaMN)への変換。反応産物の NaMN と、ADP のピークがある。

ニコチン酸の K_m 値は ATP 存在下で 0.16 mM、ATP 非存在下で 3.22 mM、 V_{max} は ATP 存在下で 0.17 Unit/mg、ATP 非存在下で 0.15 U/mg で、 K_{cat}/K_m は ATP 存在下で $1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、ATP 非存在下で $0.04 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ だった。これらの結果からこの酵素の活性は ATP 存在下で増強されることが分かった。この酵素の至適 pH は 6.0-7.0 だった(図 3)。

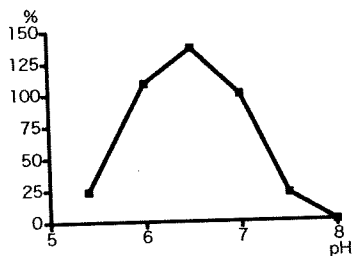


図 3. 酵素の至適 pH

ニコチン酸の代わりにピラジジン酸を基質として用いると、ピラジジン酸自体は酵素によってホスホリボシル基の転移を受けなかったが、ATPase 活性はあり、ADP が生成された(図 4)。

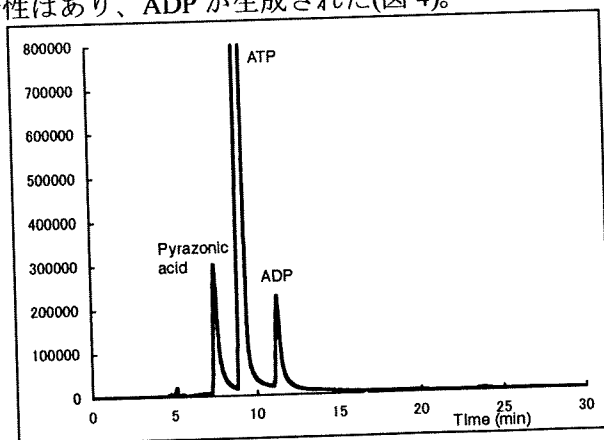


図 4. 精製酵素によるピラジジン酸(Pyrazonic acid)を基質としたときの反応。

また、ATPase 活性は、ピラジジン酸の濃度が高いほど増強されることが分かった(図 5)。

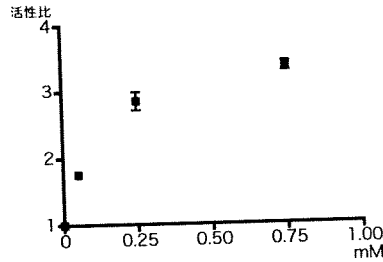


図 5. ピラジジン酸濃度と ATPase 活性の相関。

D. 考察

これらの結果から、ピラジナミドの抗菌作用のメカニズムの一つとして、ピラジジン酸がこのニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼに結合することによって菌体内で ATP の加水分解が促進されることが示唆された。

E. 結論

結核菌のニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼは、ピラジジン酸の標的分子である可能性があり、新規薬剤の標的候補となる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

臨床検体より分離された市中感染型 MRSA の検討

研究分担者 松本 哲哉 東京医科大学微生物学講座

研究協力者 山口 哲央 (東京医科大学微生物学講座)
中村 造 (東京医科大学病院感染制御部)

研究要旨 東京医科大学病院において 2007 年 7 月から 2009 年 3 月までに得られた MRSA の臨床分離株の中で、薬剤感受性をもとに CA-MRSA が疑われた菌株を *SCCmec* のタイピングをもとに解析した結果、28 株が CA-MRSA と判定された。臨床的背景の解析が可能であった CA-MRSA 分離例 25 例の年齢は平均 34.8 才 (0~74 歳) で、入院症例が 14 例、外来症例が 11 例であったが、入院症例のうち MRSA の持ち込みと考えられた症例が 5 例あった。感染と判断されたのは 17 例、保菌と判断されたものは 6 例で、不明が 3 例あった。感染例と判断された症例の感染部位は、皮膚軟部組織 8 例、耳鼻咽喉 3 例、肺炎 3 例、人工物感染 2 例で、対象症例の中には院内肺炎と推測された症例も含まれていた。これらの結果により我が国においても、CA-MRSA は純粹に市中感染として広がっているだけでなく、病院内にも CA-MRSA 株が存在している可能性が示唆された。

A. 研究目的

市中感染型 MRSA (Community Associated MRSA: CA-MRSA) は米国を中心に 1990 年代から増加傾向を示し、2000 年以降さらに拡大傾向が認められている。本菌は小児や青年期の健常人を主として感染が認められ、その大半は皮膚感染で軽症例が多いが、肺炎例では致死率が高い。

米国と比べ日本では、CA-MRSA の報告例が少なく、国内で分離される CA-MRSA の特徴については未だ不明な点が多い。そこで今回我々は、東京医科大学病院で分離された MRSA のうち、薬剤感受性結果をもとに CA-MRSA が疑われた菌株を用いて各種の解析を行った。

B. 研究方法

1) 基礎的解析

2007 年 7 月から 2009 年 3 月までの期間に東京医科大学病院の外来および入院患者から分離された MRSA 株の中で、薬剤感受性をもとに CA-MRSA が疑われた MRSA 39 株を対象とした。PCR によって *mec* 遺伝子複合体及び *ccr* 遺伝子複合体をそれぞれ検出し、その組み合わせによって *SCCmec* の型を決定し、IV および V 型を CA-MRSA と判定

した。さらに *SCCmec* のタイピングによって CA-MRSA と判定された菌株については、微量液体希釈法を用いて各種薬剤に対する感受性を測定した。

2) 臨床的解析

CA-MRSA と確定した症例のうち、診療録が参照可能であった 25 例については、記録された内容をもとに必要な情報を抽出し、レトロスペクティブに検討を行った。

(倫理面への配慮)

CA-MRSA 分離症例の個人情報に関する内容については、法律を遵守しながら取り扱った。

C. 研究結果

1) *SCCmec* のタイピング

MRSA 39 株のうち、*SCCmec* type-IV は 19 株、*SCCmec* type-V は 9 株であり、計 28 株が CA-MRSA と判定された (図 1)。なお、PCR にて PVL 遺伝子の検出を試みたが、陽性株は 1 株のみであった (*SCCmec* type-V)。

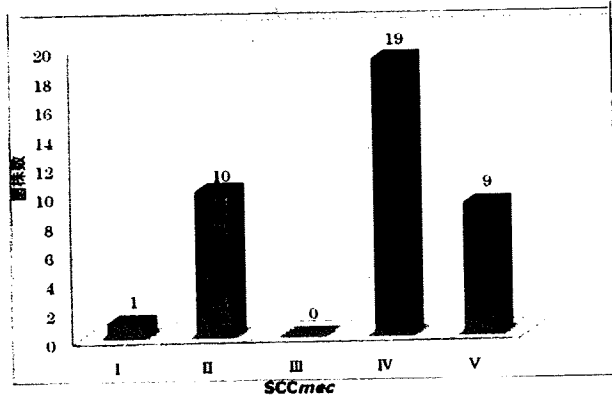


図 1. MRSA 臨床分離株の SCCmec 型別による分類

2) CA-MRSA 株の薬剤感受性成績

CA-MRSA と判定された 28 株の薬剤感受性成績を表 1 に示した。

表 1. CA-MRSA 臨床分離株の薬剤感受性成績

	GEZ	ABPC	CMZ	FMOX	CFX	IPM
MIC50	2	8	4	2	8	≤ 0.25
MIC90	16	16	8	4	16	≤ 0.25

	GM	MINO	EM	CLDM	FOM	LVFX
MIC50	8	≤ 2	0.25	0.12	≤ 32	0.5
MIC90	>8	4	>4	0.12	>128	>4

	VCM	TEIC	LZD	ABK	ST
MIC50	1	≤ 0.5	1	≤ 0.25	≤ 9.5
MIC90	1	1	2	1	≤ 9.5

(μ g/ml)

CA-MRSA はカルバペネム系抗菌薬のひとつであるイミペネム (IPM) には MIC50,90 とともに ≤ 0.25 μ g/ml と良好な感受性を示した。ただしペニシリン、およびセフェム系抗菌薬の MIC50 は 2~8 μ g/ml、MIC90 は 4~16 μ g/ml と中間的な値であった。

アミノグリコシド系抗菌薬 (GM)、マクロライド系抗菌薬 (EM)、キノロン系抗菌薬 (LVFX) に関しては、一部の菌株は耐性を示し、MIC90 が高い値を示した。

抗 MRSA 薬 (VCM, TEIC, LZD, ABK) および、

クリンダマイシン (CLDM)、ST 合剤には全般的に良好な感受性を示した。

3) CA-MRSA 分離例の疫学的解析

臨床的背景の解析が可能であった CA-MRSA 分離例 25 例の年齢は平均 34.8 才 (0~74 歳) であった (図 2)。

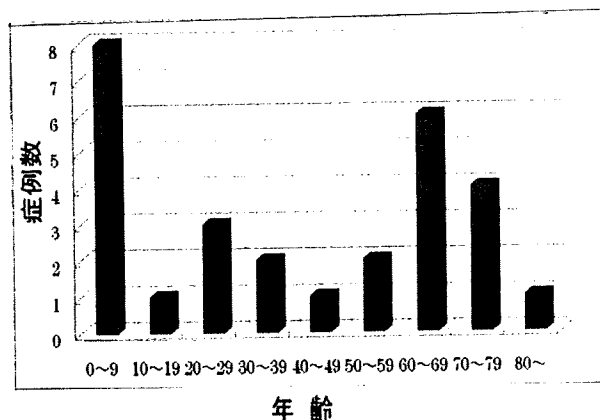


図 2. CA-MRSA 分離例の年齢分布

性別は男 15 例、女 10 例で、入院症例が 14 例、外来症例が 11 例であった。また、入院症例のうち MRSA 株が持ち込みと考えられた症例は 5 例であった。

検体の提出診療科は救命センター 7 例、皮膚科 5 例、耳鼻科 3 例、小児科 2 例、形成外科 2 例、腎臓内科 1 例、老年病科 1 例、循環器内科 1 例、整形外科 1 例、消化器外科 1 例、血管外科 1 例であった。

感染と判断されたものは 17 例、保菌と判断されたものは 6 例、不明が 3 例であった。感染例と判断された症例の感染部位は、皮膚軟部組織が 8 例、耳鼻咽喉が 3 例、肺炎が 3 例、人工物感染が 2 例であった。

D. 考察

今回の検討により SCCmec type-IV、および V といった CA-MRSA の代表的な型の株が 28 株検出された。菌株の選択は臨床検査技師により日常業務の中でなされたため、CA-MRSA であっても対象から外れる菌株が存在した可能性もあり、MRSA 全体に占める CA-MRSA の正確な割合は不明である。しかし少なくとも国内の MRSA の臨床分離株中には CA-MRSA が一部に含まれていることが明らかになった。

CA-MRSA 28 株の薬剤感受性成績による結果