

では、院内感染型の MRSA と明らかに異なり、多くの抗菌薬に良好な感受性を示した。特にイミペネム (IPM) やクリンダマイシン (CLDM) の感受性結果は特徴的であり、これらの薬剤に感受性を示す MRSA 株は CA-MRSA である可能性が示唆される。抗 MRSA 薬を除くその他の薬剤については、比較的高い MIC 値を示す菌株も存在しているため、臨床における使用は菌株毎に薬剤感受性結果をもとに判断する必要があると思われた。

CA-MRSA は諸外国においては、小児および青年期の健常人を主として分離されることが明らかになっている。今回の検討では、0～9 歳の分離例が最も多かったものの、20 代、30 代の若い世代や、60 代、70 代の高齢者層にも比較的多くの分離例が存在することがわかった。そのひとつの原因としては、今回の菌株の収集方法が、大学病院の検査部に培養目的で提出された臨床検体からの分離株であったため、当初から対象症例にバイアスがかかっていた可能性が考えられる。ただしそれを考慮したとしても、国内では高い年齢層からも CA-MRSA が分離されている状況であることが明らかとなり、今後の感染対策面で重要な示唆を与える結果であると思われた。

CA-MRSA 分離例の内訳を調べると、外来よりも入院症例から多く分離されている点の特徴的であった。しかし保菌状態で入院し発症したと思われる例も存在するため、さらに各分離患者の臨床経過も含めた解析を行ったところ、入院患者の CA-MRSA 分離例 14 例のうち、持ち込みで発症した例が 5 例いることが判明し、外来症例と合わせると半数以上が市中感染の例と考えられた。

外来では皮膚科とともに耳鼻科が多く、感染部位は皮膚・軟部組織感染や耳鼻咽喉感染で感染症例の 64% と多数を占めていた。皮膚・軟部組織感染症が CA-MRSA 感染の多くを占める点については、諸外国の報告と同様の傾向を示していたが、耳鼻科領域の感染も少なからず認められた点はこれまであまり報告されていない特徴であると考えられた。

一方、院内において CA-MRSA 感染を発症したと思われる事例もあり、その中に院内肺炎と推測される症例も含まれていた。肺炎を発症した 4 例中 2 例は死亡しており、CA-MRSA による肺炎のは予後は不良であることが今回の検討でも明らかになった。なお、肺炎と死因との関係について

は、各症例の基礎疾患や他の分離菌の存在もあるため、CA-MRSA 感染が本当に死因に関与していたかどうかについては、今後、さらに検討を重ねる必要があると考えられた。

#### E. 結論

東京医科大学病院で得られた MRSA の臨床分離株の中で、CA-MRSA と判定された 28 株をもとに解析を行った。その結果、我が国において CA-MRSA は純粋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推測された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### 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

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特許取得なし
2. 実用新案登録  
登録なし
3. その他  
なし

「抗酸菌症の耐性機構：結核菌と比較して」に関する研究

研究分担者 松本 智成 （大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部）

研究要旨

本研究では、難治性薬剤耐性菌の代表の一つである非結核性抗酸菌症、特に *Mycobacterium avium intracellulare complex* (MAC) の治療法の開発を目的とし、現在治療可能な薬剤感受性 *Mycobacterium tuberculosis complex* (TB) と MAC との間で、TB 治療の key drug となる Rifampicin (RFP) の薬剤感受性の比較に関する研究を行い、RFP において TB と薬剤感受性判定濃度が異なる MAC も同じ抗酸菌である TB と同じ MIC 感受性判定域にて判断すべきであるとの成果を得た。その結果、米国胸部疾患学会 (ATS) ガイドライン (2007) では、「肺 MAC 症に対して *Mycobacterium avium* と *Mycobacterium intracellulare* は、治療に影響がないので区別する必要がなく、クラリスロマイシンの感受性試験以外は測定しない。」と記載されているが、MAC の Minimum Inhibitory Concentration (M. I. C.) における薬剤感受性と耐性域の設定が TB とかけ離れており、TB で明らかかな RFP 耐性域にある MIC 値の MAC が RFP 感受性と判定されるので薬剤感受性試験結果と実際の臨床効果とかけはなれているのであって、同じ抗酸菌である TB とほぼ同じ薬剤感受性と耐性域に設定するとほぼ臨床結果と矛盾しなくなるので MIC に基づく薬剤感受性試験はすべきという結論になった。MAC の現在の MIC に基づく感受性、耐性判定法は、TB の MIC と比較すると現実と即していない事について明らかとする事ができ、今後の MAC の薬剤耐性の判断基準を見直す事により MAC の治療に貢献する事が期待される。

研究協力者

阿野 裕美 （大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床研究部）

A. 研究目的

米国胸部疾患学会 (ATS) ガイドライン (2007) によると、肺 MAC 症に対して *Mycobacterium avium* と *Mycobacterium intracellulare* は、治療に影響がないので区別する必要がなく、クラリスロマイシンの感受性以外は測定しないと記載されている。一方 Isoniazid (INH), Rifampicin (RFP) は、結核治療において重要な役割を示す。通常、*Mycobacterium tuberculosis* の MIC は、INH で 0.125、RFP で <0.03 である。MAC においては、INH は MIC 8 以上の耐性がほとんどであるが、RFP の場合には MIC がメーカーの推奨する感受性域にあるにもかかわらず臨床的には効果がない場合がある。はたして、MAC の場合には RFP や RFBT は MIC 測定が必要がなく、MIC 感受性であっても治療効果は期待できないのか？以上の事実から、我々は次の仮説を立てた。

仮説：MAC 治療における RFP の感受性は、測定する事に意義がある。

1. 結核菌と比較して MAC に対する RFP の

MIC 値は高く、結核治療においては耐性と判断される MIC 値でも、MAC では感受性と判断されているために治療効果との乖離を生じる。

RFP の MIC 値が RFP 感受性結核菌と同程度であれば治療の成功が期待出来るが、MIC 値が高い場合は、RFP がクラリスロマイシンの血中濃度をさげるので使用をさけた方がよい。上記の仮説を検証する為に本年度は下記研究を行った。

B. 研究方法

*Mycobacterium tuberculosis* 91 株、*Mycobacterium avium* 106 株、*Mycobacterium intracellulare* 58 株の RFP、RFB に対する感受性を proportion method、MIC 値測定 (0.0005-32) により行った。

倫理面への配慮

菌株の使用においてはあらかじめ患者からの同意を得ておりまた個人情報とは特定出来ないようになっている。

C. 研究結果

それぞれの菌株の RFP の MIC 値における最頻値は *Mycobacterium tuberculosis* 0.008、*Mycobacterium avium* 1、*Mycobacterium*

*intracellulare* 0.125 であった。同様にそれぞれの菌株の RRB の MIC 値における最頻値は *Mycobacterium tuberculosis* 0.002、*Mycobacterium avium* 0.006、*Mycobacterium intracellulare* 0.006 であった。

#### D. 考察

同じ薬剤をヒトに投与するのに、同じ *Mycobacterium* 属の TB と MAC の間で、RFP の薬剤感受性判定域が異なっている。TB の MIC 値から考慮すると、TB の細菌学的な break point は 0.03 前後であり、現在の TB の薬剤感受性判定域 (0.125 以下) は再考の必要があると判断する。TB 自体においては、ほとんどが MIC < 0.03 になるので感受性域が < 0.03 でも < 0.125 でも支障はない。しかしながら MAC においては、この TB の基準から考慮すると、ほとんどの MAC は薬剤感受性域から外れ、低濃度耐性を示している事になる。そのため、我々の仮説通り MIC 測定結果と治療効果が乖離したのであろう。しかし、少数ではあるが感受性域に入る菌もあること、RFP の MIC が高い菌に関しては、RFP を抜いたレジメも考慮すべきなので、MAC における RFP の薬剤感受性測定は必要と判断する。

#### E. 結論

同じ薬剤をヒトに投与するのに、同じ *Mycobacterium* 属の TB と MAC の間で、RFP の薬

剤感受性判定域が異なっている。RFP において MAC も TB と同じ感受性域にすべきである。MAC と TB の薬剤感受性域を同じにして評価すると MAC は、ほとんどが RFP 耐性となり現在の治療成績とほぼ矛盾しなくなる。MAC の感受性域の変更を行うと、治療時において MIC の測定は意味をなすことにより ATS の 2007 年のガイドラインは修正を要すると考察する。

同様に、TB の MIC 値から考慮すると、TB の細菌学的な break point は 0.03 前後であり、現在の TB の薬剤感受性判定域 (0.125 以下) は再考の必要があると判断する。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

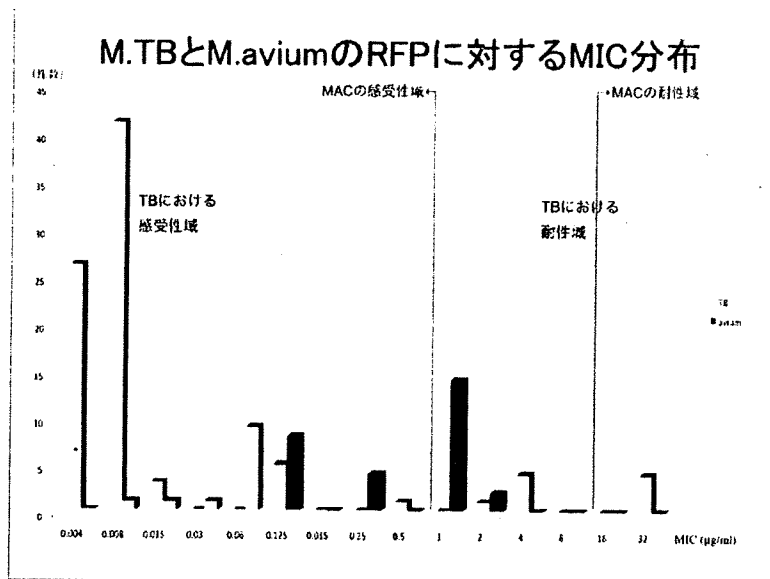
##### 2. 学会発表

第 85 回日本結核病学会 (京都) 発表予定

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図. *Mycobacterium tuberculosis* と *Mycobacterium avium* の rifampicin に対する minimum inhibitory concentration 値の比較



*Mycobacterium tuberculosis* (TB) 91 株、*Mycobacterium avium* (MAC) 106 株の rifampicin (RFP) に対する感受性を MIC 値測定 (0.0005-32) により行いその度数をグラフ化した。通常 MAC の RFP に対する感受性域は 0.5 (μg/ml) 以下であるが、TB の RFP に対する感受性域は 0.06 (μg/ml) 以下である。この同じ抗酸菌でありながら TB と MAC の RFP に対する感受性域の差が治療成績との乖離の原因となっていると判断される。

## OXA-型カルバペネマーゼの検出法の構築に関する研究

研究分担者 山口 恵三 （東邦大学大学院医学研究科微生物・感染症学講座）

### 研究要旨

本研究では、現在まで開発されていない、OXA-型カルバペネマーゼの検出法を構築すること目的として研究を行い、同酵素産生株をイムノクロマト法による検出系を構築した。本検出システムの検出感度は5ng/mLであり、院内感染で問題となるカルバペネム系薬耐性アシネトバクター属菌の感染制御あるいは耐性菌サーベイランスに貢献する事が期待される。

### 研究協力者

館田 一博 （東邦大学微生物・感染症学講座）  
石井 良和 （東邦大学微生物・感染症学講座）

### A. 研究目的

諸外国では、カルバペネム系薬耐性アシネトバクター属菌（CRA）による感染症が大きな社会問題となっている。日本でも2009年に九州地域でCARによる院内感染が発生し、この中には死者も含まれていた。この院内感染の原因菌は海外から持ち込まれたCARである可能性が指摘されている。

CARは、カルバペネム系薬分解酵素を産生することによってカルバペネム系薬を含む全てのβラクタム系薬に耐性を示す。その分解酵素は、さらにOXA-23、OXA-40、OXA-51およびOXA-58の4種類のサブグループに分類される。しかし、これらのうちOXA-24を除く酵素では、構造遺伝子が存在することが、直接酵素発現につながる訳ではない。すなわち、構造遺伝子の存在と共に、特殊な挿入配列がその酵素の発現に必須である。OXA-51は、その構造遺伝子は全ての*Acinetobacter baumannii*が保有しており、その菌種同定に応用できるほど保存されているが、同遺伝子が発現されている菌株は僅かである。

OXA-型酵素は、他のβラクタマーゼとは異なり、特異的な阻害剤も存在せず、細菌検査室において検出することは困難である。

以上の背景から、OXA-型カルバペネマーゼに対する迅速且つ簡便な検査法の構築を目的として本研究を実施した。

### B. 研究方法

OXA-型カルバペネマーゼの代表酵素としてOXA-23、OXA-40、OXA-51およびOXA-58を用いた。これらの酵素産生株は、フランスのL. Poirel博士より分与を受けた。なお、これらの菌株を用

いた実験は、東邦大学病原体等安全管理委員会、酵素の大量発現系の構築は東邦大学遺伝子組換え実験安全委員会からそれぞれ承認を得て実施した。

いずれのOXA-型カルバペネマーゼもpET系ベクターと*Escherichia coli* BL21シリーズを用いて発現させることが困難だった。そこでpColdベクターを用いたところ、それらの大量発現系の構築に成功した。4種類のOXA-型カルバペネマーゼには、いずれもヒスチジンタグを付加しており、精製は情報に従ってニッケルカラムを用いた。

OXA-23、OXA-40、OXA-51およびOXA-58の各精製酵素はFreund' incomplete adjuvantを用いて乳化し、日本白色家兎に対して免疫を行った。十分に抗体価が上昇したことを見極め、全血を採取した。なお、本抗体作成は外部業者に委託した。

4種類のOXA-型カルバペネマーゼに対するIgGは、各抗血清からプロテインAカラムを用いて定法により精製した。精製された各抗OXA-型カルバペネマーゼIgGは、金コロイド粒子を用いてラベル化した。

以上の材料を用いてイムノクロマト法によるOXA-23、OXA-40、OXA-51およびOXA-58の検出法の構築を試みた。

検出感度および特異性の検討には上記4種類の精製OXA-型カルバペネマーゼおよび当講座が保有する精製された各種βラクタマーゼを用いて実施した。また、臨床材料から分離されたOXA-型カルバペネマーゼ産生が疑われる*A. baumannii*を用いて各種OXA-型カルバペネマーゼの検出を試みた。

### C. 研究結果

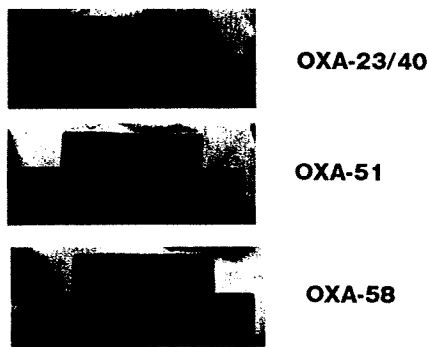
平成18年度～平成20年度までにOXA-23およびOXA-40の検出系は構築していた。今回はそれに加えてOXA-51およびOXA-58の検出系を構築した。Western blottingおよびELISAによる予備

検討の結果から、抗 OXA-23 抗体と抗 OXA-40 抗体は反応性が低いことが判明していた。そこで、両抗体を今後したところ、両酵素の検出が可能となることが判明した。現時点における検出限界は 5 ng/mL である。一方、今年度得られた抗 OXA-51 抗体および抗 OXA-58 抗体は、いずれも反応性が高いことが Western blotting および ELISA による予備検討の結果から判明していた。したがって、それぞれの酵素を区別することができる検出系を構築した。その結果、OXA-23/OXA-40 の場合と同様に、検出限界が 5 ng/mL の検出法を構築した。

## 操作法

1. 被検菌株を静置培養法により培養
2. 培地表面の菌体を掻き取り、1mLの懸濁用希釈液に浮遊
3. 菌体懸濁液を100 $\mu$ L分取
4. 金コロイド標識抗体液10 $\mu$ Lを分取して(3)の溶液と混合
5. (4)の全量をテストプレートの試薬添加部に滴下
6. 30分間静置後、目視でラインの有無を判定

### OXA-型カルバペネマーゼの検出例



Western blotting では、得られた抗体は 4 種類全ての OXA-型カルバペネマーゼと交差反応を認めた。したがって、今回構築したポリクローナル抗体を用いたイムノクロマト法による OXA-型カルバペネマーゼを検出する系でも交差反応は否定できないと考えられた。

臨床材料から分離された 26 株のパニペネム非感性 *Acinetobacter* spp. を対象にイムノクロマト法により、OXA-型カルバペネマーゼの検出を試みた。その結果、OXA-23/OXA-40 産生株が 7 株、OXA-51 産生株が 15 株、OXA-58 産生株が 4 株検出された。一方、これらの供試菌株は、予め PCR 法で確認したところ、OXA-23、OXA-40、OXA-51 および OXA-58 産生株は、それぞれ 6 株、1 株、

15 株および 5 株存在することが推察されていた。すなわち、イムノクロマト法と PCR 法による OXA-型カルバペネマーゼ産生菌検出の一致率は、96.3%であった。

## D. 考察

本邦における OXA-型カルバペネマーゼ産生株に関する疫学調査は実施されていなかった。OXA-型酵素は、アミノ酸レベルの相同性が 18% 程度のもも存在し、特異的阻害剤の創製が困難なことから、他の  $\beta$  ラクタマーゼで応用されている、簡便な方法が確立されなかった。その結果、細菌検査の現場で OXA-型カルバペネマーゼの検出ができなかった。

*Acinetobacter* spp. に対してはメロペネムやパニペネムと比較してイミペネムの抗菌力が強い。OXA-型カルバペネマーゼ産生 *Acinetobacter* spp. を検出する場合、メロペネムあるいはパニペネムに感受性を示さない菌株をまず選択する。これらのメロペネムあるいはパニペネム非感性 *Acinetobacter* spp. を対象として、4 種類の OXA-型カルバペネマーゼ構造遺伝子と 6 種類の挿入配列の組み合わせで PCR を実施していた。このような複雑な検査は、臨床検査の場で実施することは不可能である。したがって、PCR 法との一致率が 96.3%である本法は、有用な方法であると考えられた。

今後、モノクローナル抗体を作成し、さらに感度・特異度の高いシステムを構築する必要があると考えられた。

## E. 結論

OXA-23/OXA-40、OXA-51 および OXA-58 のイムノクロマト法による検出系を構築した。この方法の検出限界は 5 ng/mL であった。本邦の臨床材料から分離された菌株を対象にイムノクロマト法による OXA-型カルバペネマーゼの検出を試みたところ、遺伝子検出結果と 1 株を除き結果は一致した。モノクローナル抗体を用いるなどして、さらに感度・特異度の改善が必要であると考えられた。

## F. 健康危機情報

欧米で社会問題となっている OXA-23、OXA-40、OXA-51 および OXA-58 産生 *Acinetobacter* 属菌が日本でも分離されることが明らかとなった。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

石井良和. 薬剤耐性菌: 検査と治療の Update -日常検査における  $\beta$ -ラクタマーゼのクラス別検出法と抗菌薬選択に関する考察-. 第 21 回日本臨床微生物学会総会. 2010. 1 月. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中 (特願 2010-013090)
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

肺炎球菌のケトライド耐性機構ならびに耐性伝播機構に関する研究

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研究室）

研究要旨

本研究では、国内の肺炎球菌のテリスロマイシン（ケトライド系抗菌薬）耐性化の現況、新型耐性機構並びに耐性伝播機構を解明することを目的として、2005年～2008年に国内の1医療機関で分離された222株の肺炎球菌ならびに2009年に全国の医療機関で分離された348株の肺炎球菌についてケトライド・マクロライド耐性に関する多面的な研究を行い、マクロライド耐性は急激に進行しているが、テリスロマイシン耐性菌は現れていないことを明らかにした。しかしテリスロマイシン低感受性株が約7%の頻度で出現していたことから、分子遺伝学的解析を行い、低感受性化の主要因は *mefE/mel* 遺伝子の獲得であることを明らかにした。またその伝播にはトランスポゾン Tn2009 と Tn2010 が関与していることを明らかにした。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低感受性菌が選択されることが明らかとなり、その動向には注目が必要である。一方、14・15・16 員環マクロライド耐性に関する広範囲な研究を行ったところ、16 員環マクロライドに特異性を持った新型のマクロライド耐性機序の存在が示唆された。

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

呼吸器感染症の主要な起因菌である肺炎球菌の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、耐性機構と耐性因子の伝播機構の解明をめざす。又、本研究において分離された570株の Erythromycin(EM)耐性菌について多面的な研究を行い、新型の耐性機構を解明する。

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（ム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. PCR, DNA 塩基配列決定は定法に従った。

倫理面への配慮

本研究で得られる菌株は、分離した医療機関において、連結可能匿名化することにより、研究者に患者の特定ができないよう配慮した。また、研究成果の発表にあたっては、患者の氏名などは一切公表しないこととする。

C. 研究結果

(1)2005年～2008年にわたり国内の1医療機関で分離された222株の肺炎球菌についてケトライド・マクロライド感受性を検討し、さらに外来性マクロライド耐性因子 *ermB*, *mefE* 保有率との関連を明らかにした(図1)。89.6%が EM 耐性 (break point MIC=1 μg/ml) であるが TEL 耐性菌 (break point MIC=4 μg/ml) は含まれていなかった。し

かしながら TEL 低感受性菌 (MIC=0.5-1  $\mu$ g/ml ; 対象 : ATCC49619 MIC<sub>TEL</sub>=< 0.015  $\mu$ g/ml) が 17 株含まれていたことから低感受性化の遺伝学的な背景を検討し、下記の事実を明らかにした。

TEL 低感受性菌 17 株のうち 13 株が *mefE/mel* を保有し、4 株が *ermB* と *mefE/mel* の両方を保有していた。17 株について *mefE*, *ermB* の単独あるいは両方欠損株を構築して耐性の遺伝学的解析を行った結果、肺炎球菌は *mefE* 単独の獲得により TEL 低感受性化 (MIC=1  $\mu$ g/ml) することが明らかとなった。又 *ermB* は EM 耐性の主要原因であった。*mefE*, *ermB* の伝播機構についてトランスポゾンの関与を検討した結果、13 株による *mefE/mel* 因子単独の獲得には Tn2009-like Transposon が、4 株による *ermB* と *mefE/mel* の獲得には Tn2010-like Transposon の関与が考えられた (図 2)。

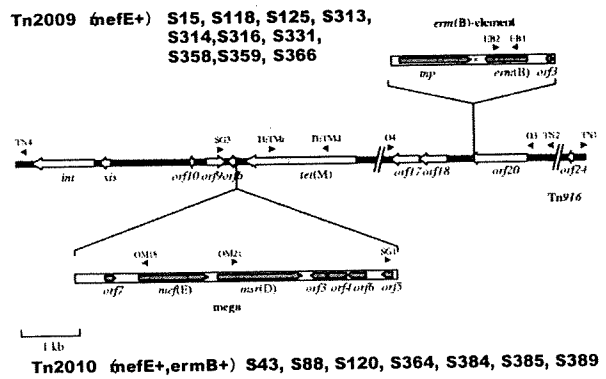


図 2 テトラサイクリン低感受性関連と推定したラポソ

株の肺炎球菌について、ケトライド感受性調査を行ったところ、TEL 耐性菌は存在しないが、TEL 低感受性菌 (MIC=1  $\mu$ g/ml) は確実に増加していることが明らかとなった。さらに、14・15・16 員環マクロライド耐性に関する広範囲な研究を行った結果、16 員環マクロライドにより高い耐性を示す耐性菌が含まれていた。

#### D. 考察

肺炎球菌の多剤耐性化が急速に進行し、中でも繁用されるマクロライドに対する高度耐性化が深刻な問題となっている。TEL はマクロライド高度耐性菌に有効であるが、欧米をはじめとする諸外国では、すでに TEL 高度耐性菌が分離され手ておりわが国においてもその出現と増加は懸念されてきた。本研究において対象とした広範な臨床分離株の中には TEL 耐性肺炎球菌は見いだせなかったことから、現在のところ国内での出現は低いものと考えられる。これは国内では TEL の使用頻度が低い現状を反映していると推察できる。TEL 低感受性菌の分子遺伝学的解析結果は、*mefE/mel* 遺伝子を持つ Tn2609, Tn2610 などの獲得によりケトライド低感受性化が起こることを強く示唆していた。

#### E. 結論

国内ではケトライド耐性菌肺炎球菌の出現は今のところ稀であるが、マクロライドのみの使用によって、ケトライド低感受性菌が選択され、低感受性菌は確実に増加していることが明らかとなった。これらはさらに耐性化することが推測されることから、それを防止する為に調査と監視を継続しつつ、実効ある対策が必要である。

#### 1. 論文発表

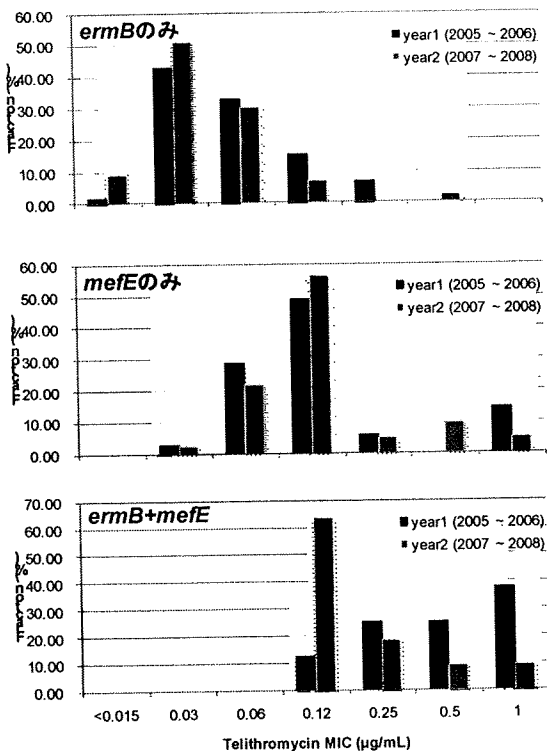


図 1 2005年~2008年臨床分離菌のケトラドマクロライド耐性因子

(2)  
2009  
年 10

月~ 11 月に全国の医療機関で分離された 348

#### G. 研究発表



Takaya, A., Kitagawa, N., Kuroe, Y., Endo, K., Okazaki, M., Wada, A., and Yamamoto, T. Mutational analysis of telithromycin-reduced susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated clinically in Japan. FEMS Microbiol. Letter, submitted

## 2. 学会発表

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

袴田浩、笠蔦夕子、遠藤菊太郎、高屋明子、山本友子 テリスロマイシン耐性肺炎球菌のマクロライド系耐性機序 第 133 回薬学会北海道支部例会

## 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

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

薬剤耐性肺炎球菌の疫学と耐性機序の解析  
—侵襲性感染症由来 19F の薬剤耐性と PBP 変異の解析—

研究分担者 和田昭仁 (国立感染症研究所細菌第一部)

**研究要旨** 小児侵襲性感染症由来肺炎球菌のうち、血清型 6B, 14, 19F, 23F 各々46 株、23 株、20 株、20 株を対象とし、ペニシリン G とセフトキシムの MIC を測定した。血清型 6B, 14, 23F では、ペニシリン G の MIC 分布は二峰性を示したのに対し、セフトキシムの MIC は一峰性を示した。血清型 19F では、ペニシリン G の MIC が 1-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示したのに対し、セフトキシムの MIC は 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最大頻度とし 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  までの分布を示した。MIC 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示した菌は PBP2x のペニシリン結合部位ないしその近傍に Thr338Ala に加え、Met339Phe, Thr343Met の変異を持っていた。特定のシーケンスタイプの中でも、新たな変異を獲得した菌の存在が確認された。

**A. 研究目的** 7価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV7)は、2009 年に承認され、2010 年 2 月より上市された。このワクチンの小児侵襲性感染症由来肺炎球菌のカバー率は 77.8%(6A を含めた場合は 83.1% [厚生労働省神谷班])である。当初は任意接種として開始されるが、集団免疫効果(接種群のみならず、成人も含めた非接種群に対して効果をもたらすこと)を発揮するためには、50%を超える高い接種率が必要であるとされている。PCV7 に含まれる肺炎球菌の血清型のうち、6B, 14, 19F, 23F は、薬剤耐性が問題となる血清型であり、小児侵襲性感染症由来肺炎球菌の 67.4%を占める。本年度の研究では、侵襲性感染症由来肺炎球菌の血清型 6B, 14, 19F, 23F 分離株のペニシリン G とセフトキシム感受性を比較検討し、血清型 19F 分離菌

に対しては、セフトキシムの耐性と PBP 遺伝子の変異の関係について解析を行った。

**B. 研究方法** 小児侵襲性感染症由来 6B, 14, 19F, 23F 各々46 株、23 株、20 株、20 株を対象とし、ペニシリン G とセフトキシムの MIC を、CSLI M100-S18 に従い微量液体希釈法にて測定した。また、血清型 19F、18 株の PBP2x 遺伝子の解析を行い、 $\beta$ -ラクタム剤耐性と関連のある変異の検出を行った。

**倫理面への配慮** 本研究では分離された菌株のみを対象とし、その菌が由来する個人情報 は扱っていない。

**C. 研究結果** 血清型 6B の分離菌のペニシリン G とセフトキシムの MIC 分布を図 1 に示す。ペニシリン G の MIC が 0.03-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲に二峰性の分布を示したのに対し、セフトキシムの MIC は中央値が 0.5

μg/mL の一峰性の分布を示した。これは血清型 14, 23F においても同様であった(図 2、図 3)。これらのことは、本邦で分離される血清型 6B, 14, 23F の菌は、ペニシリン感受性域の菌であってもセフトキシムに対しては感受性が低下していることを示している。血清型 19F の菌では、20 株中 1 株を除きペニシリン G の MIC は 1-2 μg/mL に集中していたが、セフトキシムの MIC は 0.5-2 μg/mL に分布していた(図 4)。血清型 6B, 14, 23F の菌のマルチローカスシーケンスタイプ(MLST)解析を行うと、これらの血清型分離菌は、各々複数のシーケンスタイプ(ST)をもつ菌からなることが判明した(図 1-3)。一方、血清型 19F の菌では、ペニシリン G の MIC 0.25 μg/mL を示した 1 株を除き、残りの 19 株は ST236 ないしその近縁の菌であることが判明した(図 4)。ペニシリン G の MIC 分布(1-2 μg/mL)は、遺伝的背景が近縁の群が示す値として納得できるものであったが、0.5 μg/mL を最大頻度とし、2 μg/mL まで分布するセフトキシムの MIC(図 4)に対しては、より詳細な解析が必要であると考えられた。

そこで、血清型 19F 分離株のうち、18 株の PBP2 x 配列の比較を行った。セフトキシムの MIC 0.5-1 μg/mL を示したすべての株ではペニシリン結合部位 Thr338Ala の変異のみが見られたが、セフトキシムの MIC 2 μg/mL を示した株 3 株は、Thr338Ala 変異に加え、その近傍にも Met339Phe, Thr343Met 変異を持っていた。また、これらの株は、ペニシリン結合以外の他の部分にも変異をもっていた(表 1)。

**D. 考察** PBP2 x の Thr338Ala, Met339Phe 変異はセフトキシムの MIC  $\geq$  2 μg/mL と関連した変異として知られている

(Sanbongi Y et al, Antimicrob Agents Chemother 48:2244-225, 2004)。米国では、PCV7 の導入により、19F の分離頻度の減少が見られたが、PCV7 導入前には血清型 19F の菌には複数の ST が見られていた(Beall B et al, J Clin Microb 44:999-1017, 2006)。一方、わが国では、ワクチン導入前の血清型 19F の菌は ST236 とその近縁のシーケンスタイプが 95%以上を占めている。わが国においても、PCV7 導入により、米国同様に血清型 19F の分離頻度減少が見られるかどうかは不明である。

今回の研究により、血清型 19F、ST236 のなかでもセフトキシムの MIC 2 μg/mL を示す菌は、Thr338Ala に加え、Met339Phe, Thr343Met の変異を持っていることが判明した。このことは、特定のシーケンスタイプを持つ菌の中でも、より高い薬剤耐性形質を獲得するために、新たな変異が蓄積していることを示している。2010 年までの調査では、小児侵襲性感染由来肺炎球菌の中で、メロペネムに非感受性(MIC  $\geq$  0.5 μg/mL)を示す菌の割合は 1.8%に過ぎないが、メロペネムの MIC 0.25 μg/mL を示す菌は全体の 20%以上も見られている。PCV7 導入後も、血清型、シーケンスタイプに加え、特定の薬剤耐性変異を持つクローンの継続的なモニタリングが必要であると考えられた。

**E. 結論** 7 価コンジュゲートワクチン導入後も血清型、シーケンスタイプに加え、薬剤耐性肺炎球菌の継続的なモニタリングが必要である。

**F. 健康危機情報**

なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表

なし

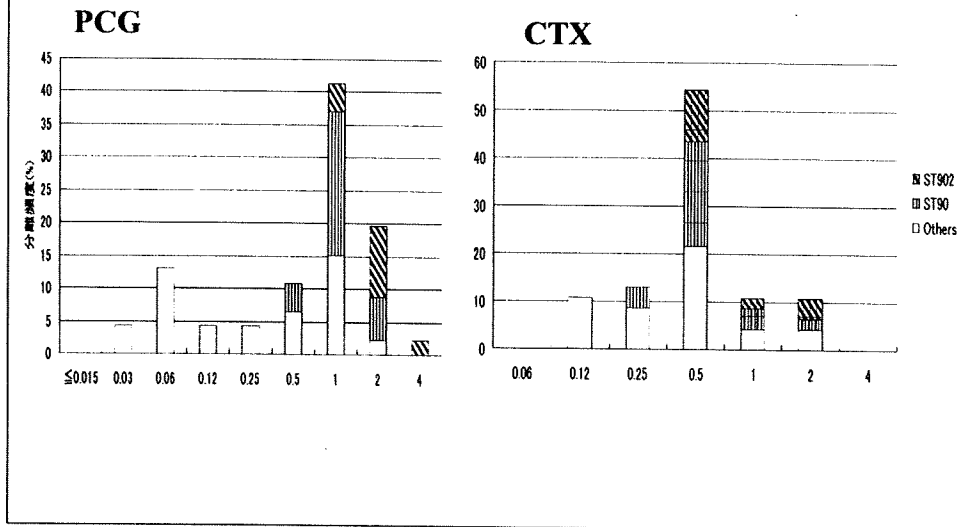
2. 学会発表

第83回日本感染症学会総会(2009/4 東京)  
血清型 6B, 6A 及び 19F 肺炎球菌の MLST と  
薬剤感受性の関連

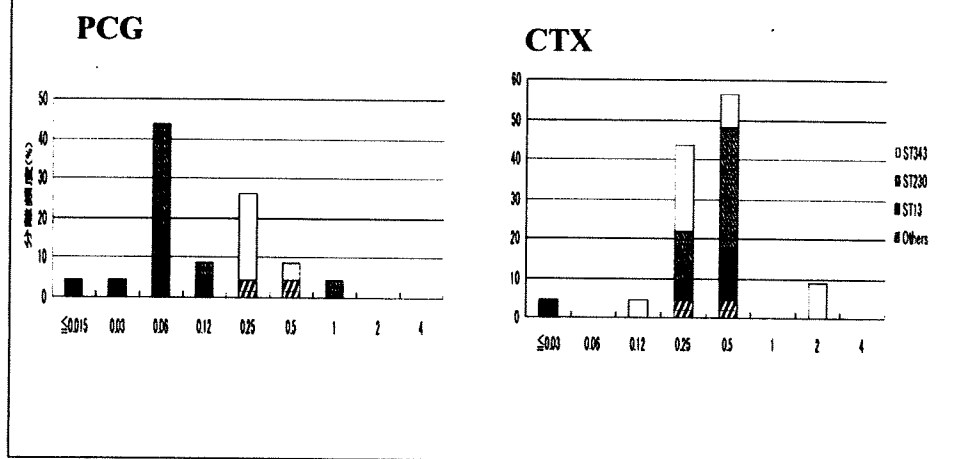
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

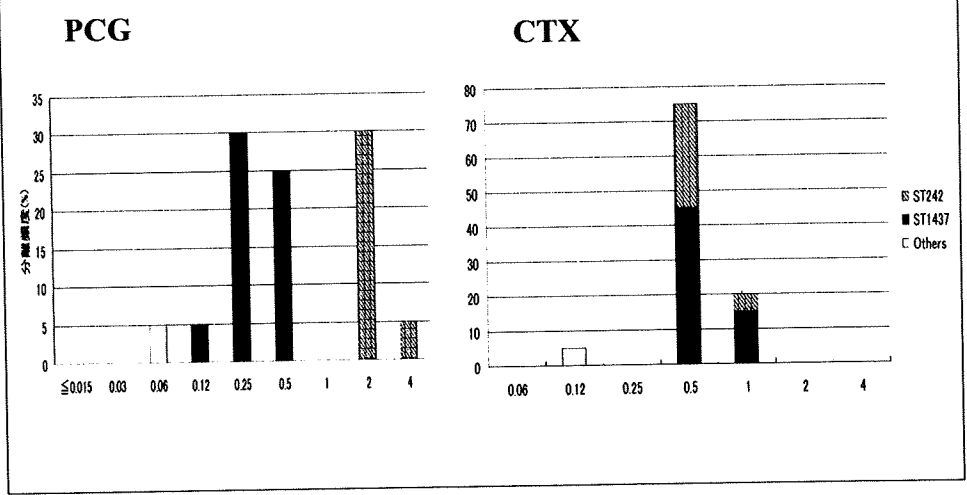
**図1**  
6B分離菌のシーケンスタイプとMICの関係



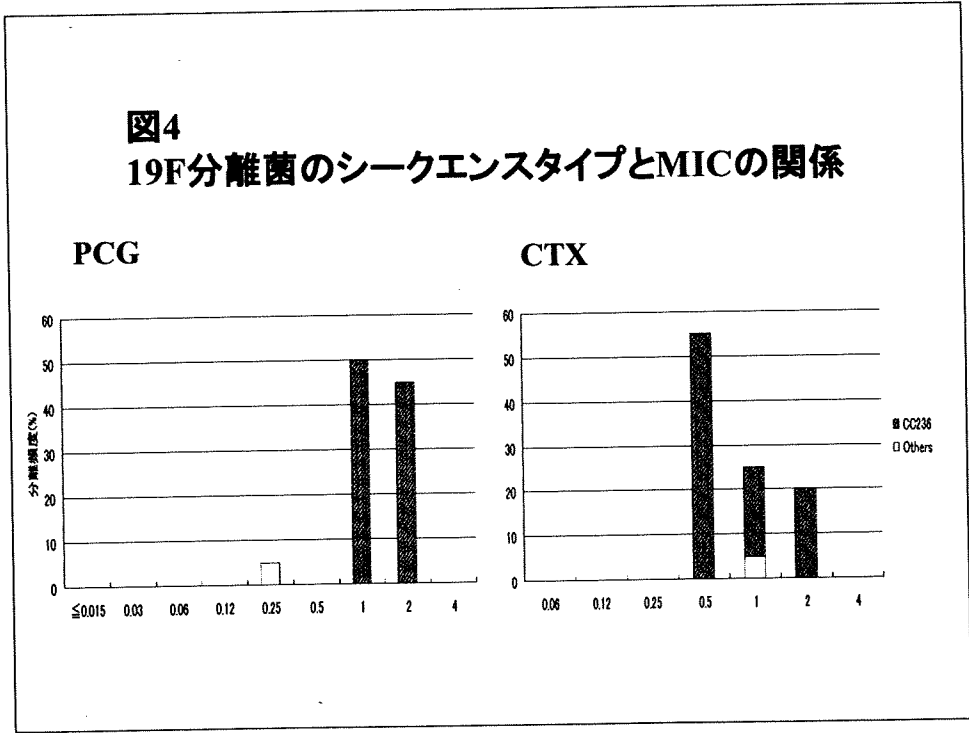
**図2**  
血清型14分離菌のシーケンスタイプとMICの関係



**図3**  
23F分離菌のシーケンスタイプとMICの関係



**図4**  
19F分離菌のシーケンスタイプとMICの関係



**表1**

**19F分離菌のPBP2X変異とCTX MICの関係**

	CTX MIC	132D	134A	137K	141S	152A	170E	172E	338T	339M
KSP10	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP16	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP25	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP46	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP58	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP59	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP93-1	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP135	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP165	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP175	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP65	1	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP171	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP52	0.5	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP32	1	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP144	1	*	*	*	*	*	*	*	A	*
KSP108	2	*	*	*	A	*	K	S	A	F
KSP190	2	*	*	*	A	*	K	S	A	F
KSP158	2	E	S	R	*	S	*	*	A	F

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kimura K, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata N, Arakawa Y.	Practical disk diffusion test for detecting group B streptococcus with reduced penicillin susceptibility	J. Clin. Microbiol.	47	4154-4157	2009
Nagano N, Kimura K, Nagano Y, Yakumaru H, Arakawa Y.	Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral decubitus ulcer	J. Antimicrob. Chemother.	64	1326-1328	2009
Ohkura T, Yamada K, Okamoto A, Baba H, Ike Y, Arakawa Y, Hasegawa T, Ohta M.	Nationwide epidemiological study revealed the dissemination of meticillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> carrying a specific set of virulence-associated genes in Japanese hospitals.	J Med Microbiol.	58	1329-1336	2009
Yamaguchi Y, Sato G, Yamagata Y, Doi Y, Wachino J, Arakawa Y, Matsuda K, Kurosaki H	Structure of AmpC beta-lactamase (AmpCD) from an <i>Escherichia coli</i> clinical isolate with a tripeptide deletion (Gly286-Ser287-Asp288) in the H10 helix.	Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.	1(65)	540-543	2009
Park YJ, Yu JK, Kim SI, Lee K, Arakawa Y.	Accumulation of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes, <i>qepA</i> and <i>qnrS1</i> , in <i>Enterobacter aerogenes</i> co-producing RmtB and class A $\beta$ -lactamase LAP-1.	Ann Clin Lab Sci.	39(1)	55-59	2009
Piao Z, Shibayama K, Mori S, Wachino J, Arakawa Y.	A novel insertion sequence, IS1642, of <i>Mycobacterium avium</i> , which forms long direct repeats of variable length.	FEMS Microbiol Lett.	291(2)	216-221	2009

#### IV. 研究成果の刊行物・別冊・資料

**Table 1.** Characteristics of the five MRSA strains<sup>a</sup> isolated from food samples in this study

Origin	MLST/spa	SCCmec	agr	MIC (mg/L)										Amino acid change		Resistance genes detected	
				OXA	FOX	TET	TOB	KAN	STR	ERY	CLI	CIP	LEV	GrlA	GyrA		
Pork	ST398/t011	V	I	8	16	128	0.25	2	256	>256	>256	>128	0.125	0.125	NP	NP	mecA, tet(K), tet(M), erm(A), erm(C)
Veal	ST398/t1197	V	I	64	32	128	32	32	8	>256	>256	>128	2	0.5	S80F	S84L	mecA, tet(K), tet(L), tet(M), ant(4')-Ia, aph(3'), erm(C), msr(A)
Chicken	ST125/t067	IVa	II	128	128	0.25	>256	128	8	0.25	0.25	0.06	64	4	S80F	S84L	mecA, ant(4')-Ia, aph(3')
Rabbit	ST125/t067	IVa	II	128	128	0.25	>256	128	8	>256	>256	>128	64	4	S80F	S84L	mecA, ant(4')-Ia, aph(3'), erm(A), erm(C), msr(A)
Wild boar	ST217/t032	IVa	I	32	32	0.125	0.25	2	8	0.25	0.25	0.06	16	4	S80F	S84L	mecA

OXA, oxacillin; FOX, cefoxitin; TET, tetracycline; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; STR, streptomycin; ERY, erythromycin; CLI, clindamycin; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; NP, not performed.

<sup>a</sup>The five strains were susceptible to the following seven antibiotics by the disc diffusion method: gentamicin; chloramphenicol; trimethoprim/sulfamethoxazole; vancomycin; teicoplanin; mupirocin; and fusidic acid.

## Research letters

Unveiling the role of MRSA ST398 as a zoonotic foodborne pathogen requires more research.

## Funding

This study was financially supported by Project SAF2009-08570 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain. C. L. has a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain, and M. L. and E. G.-S. have a fellowship from the Gobierno de la Rioja of Spain.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- Witte W, Strommenger B, Stanek C *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg Infect Dis* 2007; **13**: 255–8.
- de Boer E, Zwartkruis-Nahuis JTM, Wit B *et al.* Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int J Food Microbiol* 2009; **134**: 52–6.
- Pu S, Han F, Ge B. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol* 2009; **75**: 265–7.
- Domínguez E, Zarazaga M, Torres C. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* isolates obtained from fecal samples of healthy children. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2638–41.
- Qi W, Ender M, O'Brien F *et al.* Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5164–70.
- Pérez-Vázquez M, Vindel A, Marcos C *et al.* Spread of invasive Spanish *Staphylococcus aureus* spa-type t067 associated with a high prevalence of the aminoglycoside-modifying enzyme gene *ant(4')-Ia* and the efflux pump genes *msrA/msrB*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 21–31.
- Jones TF, Kellum ME, Porter SS *et al.* An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**: 82–4.

*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*

doi:10.1093/jac/dkp374

Advance Access publication 16 October 2009

## Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral decubitus ulcer

Noriyuki Nagano<sup>1,2</sup>, Kouji Kimura<sup>1</sup>, Yukiko Nagano<sup>1</sup>, Hiroaki Yakumaru<sup>3</sup> and Yoshichika Arakawa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Musashi-murayama, Tokyo 208-0011, Japan; <sup>2</sup>Medical Microbiology Laboratory, Funabashi Municipal Medical Center, 1-21-1 Kanasugi, Funabashi, Chiba 273-8588, Japan; <sup>3</sup>Department of Plastic Surgery, Funabashi Municipal

## Research letters

Medical Center, 1-21-1 Kanasugi, Funabashi,  
Chiba 273-8588, Japan

Keywords: *Streptococcus agalactiae*,  $\beta$ -lactams, infection,  
PBP 2X alterations, MLST

\*Corresponding author. Tel: +81-42-561-0771;  
Fax: +81-42-561-7173; E-mail: yarakawa@nih.go.jp

Sir,

Penicillin is the first-line antibiotic for group B streptococci (GBS) in disease therapy as well as in intrapartum chemoprophylaxis because resistance to this agent has so far not been reported among GBS clinical isolates. However, we have recently reported GBS isolates with reduced penicillin susceptibility (PRGBS), where altered penicillin-binding protein (PBP) 2X demonstrates a major contribution to the reduction of  $\beta$ -lactam susceptibility.<sup>1</sup> We have also shown a diversity of mutations in PBP genes among PRGBS, while those genes of the penicillin-susceptible strains were highly conserved, irrespective of their isolation dates.<sup>2</sup> Those PRGBS isolates have been mostly recovered from respiratory specimens. Here, we report a case of a lasting sacral decubitus ulcer from which PRGBS were isolated repeatedly, together with the molecular characteristics of the isolates.

A 58-year-old man underwent descending graft replacement of a Stanford type B dissecting aortic aneurysm at our medical centre. After the operation, the patient developed paraplegia, which was not improved after axillofemoral bypass surgery. He was then transferred to a special physical rehabilitation centre. During his prolonged rehabilitation stay, a severe decubitus ulcer developed in the sacral area, wound bleeding was seen and he was referred to our centre. He had not received antimicrobial treatment for more than 3 months except for a 1 day intravenous injection of piperacillin (2000 mg/day) due to the occurrence of a fever just 3 days before hospital admission. Bacterial culture of the specimen taken at the surface of the decubitus ulcer at his initial visit yielded heavy growth of GBS as well as small numbers of group G streptococci and *Proteus mirabilis*. GBS was still predominant together with group G streptococci, and a small number of *Staphylococcus aureus*, in a similar sample taken on the day of admission, which corresponded to 22 days after his initial visit. On day 6, operative treatment of the decubitus ulcer by debridement followed by a rotation flap was performed. After 4 day intravenous administration of cefazolin (2000 mg/day) starting on day 6, an agent used for conventional post-operative treatment in our medical centre, only *S. aureus* was recovered from post-operative fistula exudates.

The GBS serotype Ia isolates, which were detected at intervals, were PRGBS with a penicillin MIC of 0.25 mg/L determined by a broth microdilution method with a MicroScan MICroFAST panel type 3J system (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tokyo, Japan) as described previously.<sup>2</sup> MICs of ampicillin, cefazolin and cefotaxime were 0.25, 2 and 1 mg/L, respectively (Table 1). PFGE patterns of *ApaI*-digested DNA<sup>1</sup> of these two isolates were identical. Multilocus sequence typing (MLST) was performed using specific primers as described previously.<sup>3</sup> Amplification of seven housekeeping genes, *adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* and *tki*, by PCR was carried out using PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara Shuzo Co.,

Table 1. MICs of antimicrobials for PRGBS isolates

Antimicrobial agent	MIC (mg/L)
Penicillin	0.25
Ampicillin	0.25
Cefazolin	2
Cefotaxime	1
Cefotiam	>4
Cefixime	>1
Cefepime	2
Cefozopran	1
Cefditoren	0.25
Meropenem	0.25
Clarithromycin	$\leq$ 0.12
Erythromycin	$\leq$ 0.12
Clindamycin	$\leq$ 0.12
Levofloxacin	>8

Kyoto, Japan) with reaction conditions of one cycle of 98°C for 1 min, followed by 30 cycles of 98°C for 10 s, 55°C for 15 s and 72°C for 1 min, and finally one cycle of 72°C for 7 min. PCR products were purified and sequenced.<sup>2</sup> Allelic profile assignment and sequence type (ST) determinations were made using the GBS MLST databases (<http://pubmlst.org/sagalactiae>). Both PRGBS were found to have ST-1 with allelic profile 1121122, which has been a heterogeneous lineage comprising mainly serotype V and various other serotypes, and has been identified among carriage and invasive isolates.<sup>4</sup> Thus, those PRGBS were regarded as genetically identical by PFGE and MLST.

The nucleotide and deduced amino acid sequences of PBP 2X from the two PRGBS isolates (GenBank accession number AB512415) were compared with those from the 2603V/R reference strain (ATCC BAA-611; GenBank accession number NC\_004116). The PRGBS isolates shared amino acid substitution V405A, which has been found to be a key substitution, together with Q557E, responsible for penicillin non-susceptibility in PBP 2X.<sup>1,2</sup> In addition, the isolates shared three substitutions, G398A,<sup>1</sup> G329V and G429D, where the latter two were new substitutions for PRGBS. The G429D substitution, which corresponds to the G422D substitution in *Streptococcus pneumoniae*, may possibly be a compensatory mutation, as has been suggested for *S. pneumoniae*.<sup>5</sup>

In this case, PRGBS was consecutively and predominantly isolated from a sacral decubitus ulcer as a cause of mixed infection, and thus was found to be capable of surviving persistently at the site of infection, for >3 weeks. It remains unclear whether or not the results of *in vitro* penicillin non-susceptibility of PRGBS would predict the clinical significance of this kind of microbe in antimicrobial chemotherapy. Despite the relatively high MIC of cefazolin, 2 mg/L for this PRGBS, 4 day intravenous administration of cefazolin (2000 mg/day) seemed effective in this case, but accumulation of clinical data on an appropriate antimicrobial therapeutic strategy would be essential, especially in the cases of sepsis or meningitis in both neonates and elderly individuals.