

- 74) Shafie SS, Alishaq M, Garcia ML: Investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in trauma intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 56:101-105, 2004.
- 75) Shafie SS, Alishaq M, Garcia ML: Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in French hospital. *J. Clin. Microbiol.* 41:3542-3547, 2003.
- 76) Huang Y-C, Su L-H, Wu T-L, et al.: Outbreak of *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a neonatal intensive unit: clinical implications and genotyping analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21:1105-1109, 2002.
- 77) Van Dessel H, Kamp-Hopmans TEM, Fluit AC, et al.: Outbreak of a susceptible strain of *Acinetobacter* species 13 (*sensu* Tjernberg and Ursing) in an adult neurosurgical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 51:89-95, 2002.
- 78) Fierobe L, Lucet J-C, Decre D, et al.: An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill surgical patients. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 22:35-40, 2001.
- 79) Ling ML, Ang A, Wee M, et al.: A nosocomial outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* originating from an intensive care unit. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 22:48-49, 2001.
- 80) Roberts SA, Findlay R, Lang SDR: Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. *J. Hosp. Infect.* 48:228-232, 2001.
- 81) Tankovic J, Legrand P, Gatines G, et al.: Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 32:2677-2681, 1994

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
特になし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

表1. 各論: アシネトバクター属についての一覽表 (アウトブレイクの性格)

年	文献	病棟規模 (病床数)	Outbreak 期間 *(日)	病棟	病棟規模 (病床数)	保菌および 感染数	汚染源または感染源	伝播経路
2010	Infect Cont Hosp Epidemiol 31:416-420, 2010	不明	200	ICU	19	43	不明	不明
2010	Am J Infect Control 38:259-263, 2010	850	73	外科/内科ICU	18		ICUの水平排管システム	排水システムからのエアゾルで汚染された 医療従事者の手指、物品、環境との接触
2009	J Hosp Infect 72:234-242, 2009	不明	450	ICU	不明	6	医療従事者の手指保菌?	接触感染?
			23	ICU		12		
			62	ICU		6		
2009	Infect Cont Hosp Epidemiol 30:257-263, 2009	1521	330	内科成人ICU	不明	6	不明	不明
				外科ICU		22		
2009	Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28:1281-1284, 2009	297	210	ICU	8	21	不明	不明
2009	Infect Cont Hosp Epidemiol 30:34-38, 2009	2000	365	内科ICU	不明	14	医療従事者の手指保菌 患者周囲環境及び医療機 器・物品	接触感染
				呼吸器ICU		38		
				内科ICU		24		
2008	J Chemother 20:219-224, 2008	1500	120	呼吸器ICU	不明	15	医療従事者の手指保菌?	接触感染?
				ICU		13		



表2. 各論：アシネトバクター属についての一覧表 (アウトブレイクの制御対策)

年	文献	アウトブレイク発生時の対策		備考
		標準 予防策	その他	
2010	Infect Cont Hosp Epidemiol 31:418-420, 2010	○	ICUを閉鎖(3日間)、1日3回1%中性洗剤で洗浄後、70%アルコールを塗りこませた雑巾で拭拭	再アウトブレイク発生時の追加対策 洗剤を酸化殺菌剤に変更
2010	Am J Infect Control 38:259-263, 2010	○	・医療従事者の院内感染教育 ・シンクアラッシュプロトコルの実施(第1週は毎日1回、その後は毎週1回)	
2009	J Hosp Infect 72:234-242, 2009	○	ICUを閉鎖(10日間)、環境の清掃・消毒を	
2009	Infect Cont Hosp Epidemiol 30:257-263, 2009	○	・抗菌薬の使用制限 ・環境調査とアウトブレイク・サーベイランス ・環境清掃のプロトコルの見直しと徹底的な清掃 ・医療従事者の院内感染教育	アウトブレイク・サーベイランスでは内科ICUで4患者に、外科ICUで27患者に定着がみられた
2009	Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28:1281-1284, 2009	○	・抗菌薬(カルバペナム系)の使用制限 ・全ICU従事者に対するアウトブレイクの告知 ・感染症専門医との連絡	・感染患者の生理検査数及び感染患者への他人の訪問回数の制限 ・全ての環境表面の0.1%次亜塩素酸塩による消毒
2009	Infect Cont Hosp Epidemiol 30:34-38, 2009	○	環境清掃と消毒	抗菌薬の使用制限
2008	J Chemother 20:219-224, 2008	○	・新規入院を一時的に停止し、ICUを感染・定着患者用と非感染・定着患者用に分割 ・専任看護師によるケア	新規入院を再び一時的に停止し、ナースセンター、ドクタールーム、トイレ、受付、機器・物品の感染・定着患者用と非感染・定着患者用への分割



表3. 文献の年度別内訳

年	文献数	
	調査文献	表中文献
2006～2010	26	17
2001～2005	19	18
1996～2000	10	8
1991～1995	9	7
1986～1990	10	8
1981～1985	1	1
～1980	6	5
合計	81	64

図1. アウトブレイクを起こした
アシネトバクター属の内訳
(64文献)



1文献は*A. baumannii*と*Acinetobacter* DNA group 13TUの重複感染であった。
*Acinetobacter lowffi*のアウトブレイクは後に偽アウトブレイクであったことが判明した。
*Acinetobacter calcoaceticus*によるアウトブレイクの報告は、1997年と1994年の2文献を除くといずれも1991年より以前のものである。

表4. 推定アウトブレイク期間

アウトブレイク期間	文献数
<2週間	0
≥2週間~<1カ月	4
≥1カ月~<3カ月	7
≥3カ月~<6カ月	18
≥6カ月~<9カ月	14
≥9カ月~<12カ月	8
≥12カ月~<18カ月	9
≥18カ月	2
不明	2
合計	64

平均値:217.1日、中央値:180日

図2. 再アウトブレイク例の頻度

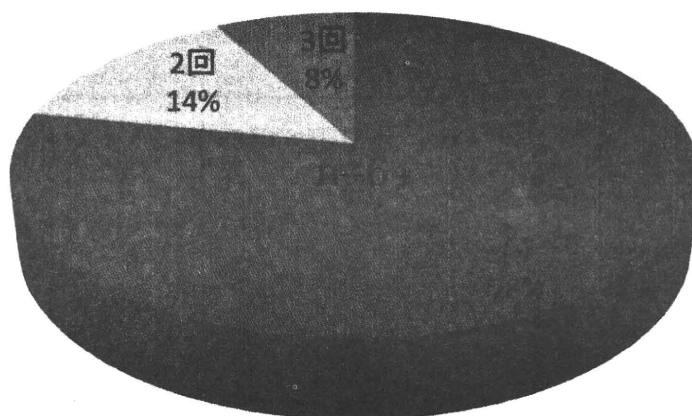


図3. アウトブレイクが発生した病棟の内訳

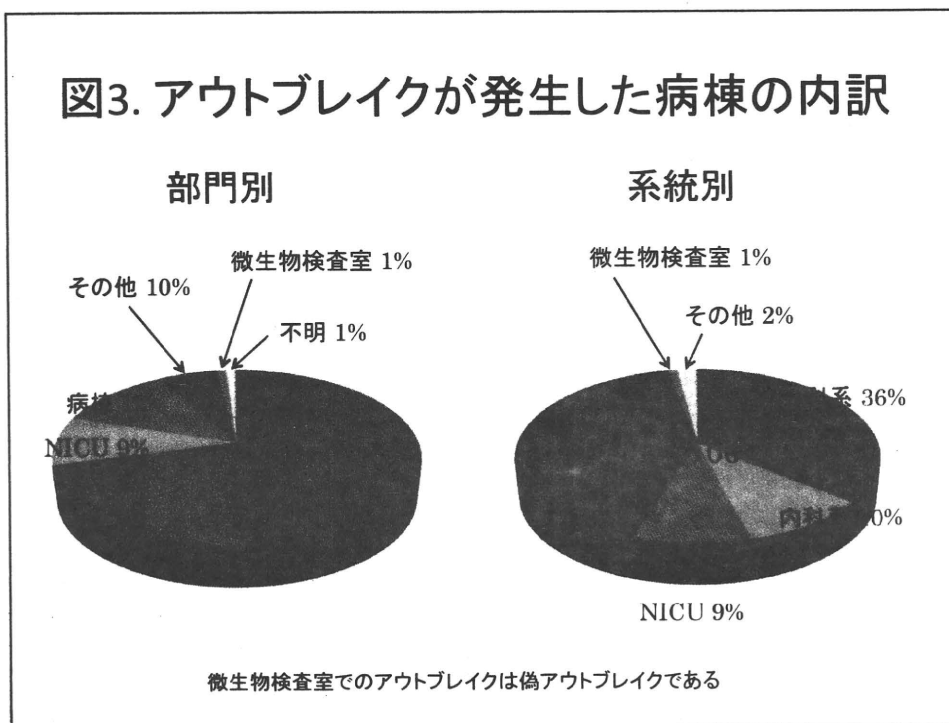


図4. アウトブレイク判明時にとられた対策

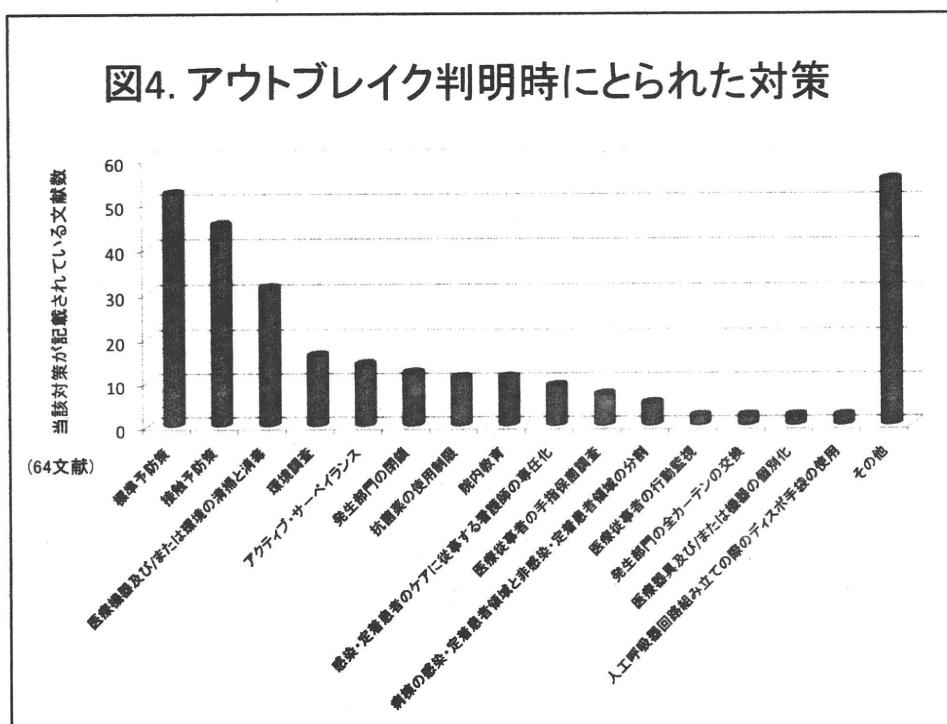


表5.
アシネトバクター属の
院内アウトブレイクの
伝播経路及び感染源

64文献中51文献で66の伝播経路
及び感染源が同定されたが、13文
献では感染源が不明であった

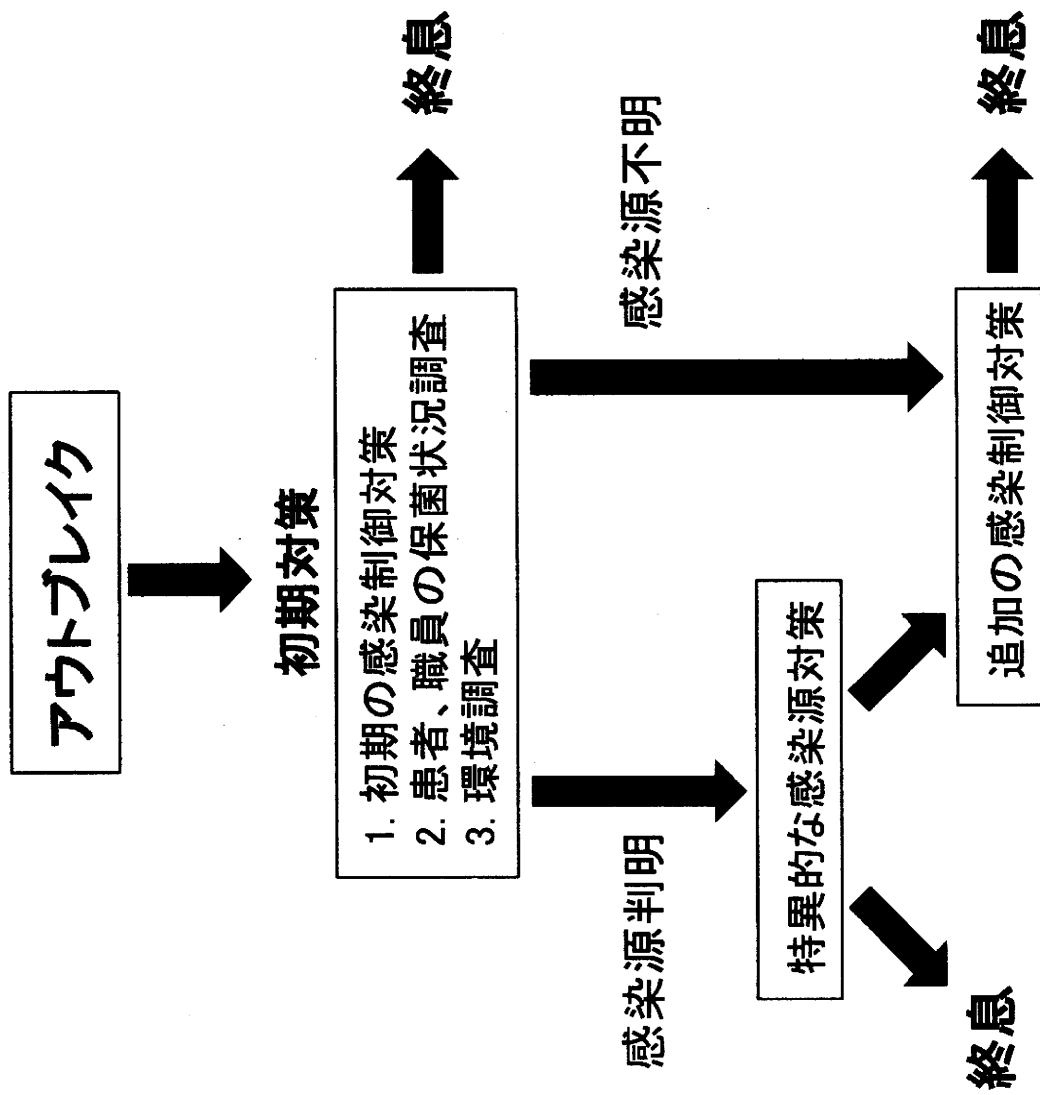
接触感染	62	
ヒート伝播	24	
医療従事者の手擦・使用した手袋	23	
他の患者	1	
患者あるいは患者環境	6	
機器・環境-ヒート伝播	32	
人工呼吸器	10	
回路チューブ	2	
ピークフローメーター	1	
回路の温度計、酸素プローブ、圧電センサー	1	
圧モニターラインのデマンド式バルブリザーバー	1	
スパイロメーター	1	
その他	4	
医療機器	5	
水治療室を行う環境・器具	2	
吸引	2	
吸引器	1	
吸引カテーテル	1	
希釈モルヒネ溶液	1	
経静脈栄養液	1	
持続陽圧(OPAP)マスク	1	
血圧計のカフ	1	
親水性コロイドドレッシング(吸水性包帯)	1	
コンピューターキーボードのプラスチックカバー	1	
ベッド終	1	
呼吸治療ネブライザー	1	
羽毛枕	1	
'アンビュー' 衛生バッグ	1	
加温Wright呼吸計	1	
ウォーターバス	1	
非加熱室内加湿器	1	
空調	1	
水平排管システム	1	
空気感染	4	
水治療室に使用する洗浄ガン	2	
開放性吸引	1	
患者ベット周囲のカーテン	1	
不明	13	

表6. アウトブレイクが遷延あるいは再発した場合
の感染制御対策

対策	%	件数
環境洗浄・消毒の実施あるいは変更	27%	10
発生部門の閉鎖	14%	5
追加対策はなし	14%	5
抗菌薬の使用制限	5%	2
感染患者の生理検査数及び感染患者への他人の訪問回数の制限	3%	1
看護師と清掃従事者との間の清掃に関する責任分担の明確化	3%	1
病棟の清掃従事者の補充	3%	1
アクティブ・サーベイランス	3%	1
前対策の強化	3%	1
接触感染予防策	3%	1
仕切りカーテンのドライクリーニング	3%	1
ベットのつい立ての交換	3%	1
マットレスカバーの調査(過度の摩損や滲みがあったら交換)	3%	1
その他	11%	4
不明	5%	2
合計	100%	37

16施設で再アウトブレイクに対して37対策が実施された

図4. アウトブレイク終息に向けての一般的な対応の流れ



JANIS 事業の全般に関する安定運用と改善、精度向上に関する研究

研究分担者 山根 一和 （国立感染症研究所細菌第二部）

（研究要旨）

本研究では、JANIS 検査部門のデータ精度を向上させるために、疑義のある薬剤感受性判定の基礎データとなる MIC 値の精度管理基準を作成することを目的とする。JANIS 検査部門参加医療機関から 2009 年 1 月 1 日～12 月 31 日に提出されたすべてのデータのうち、薬剤感受性検査を行っているデータを対象とし、疑義のあるデータを抽出した。正しいと考えられるデータの条件は、1. MIC 値が 2 のべき乗で報告されたデータ、2. 薬剤感受性検査測定法コードが Etest を意味する「41」に設定されたデータ、3. サルファメトキサゾール/トリメトプリム（ST 合剤）の MIC 値が 10×2^n で報告されたデータとし、1-3 に該当しないデータを疑義のあるデータとした。該当するデータを報告した医療機関に対し、電子メールで確認を行った。232 医療機関から提出された 84,123 件のデータが疑義のあるデータと考えられた。131 医療機関（56.5%）から送信された 57,046 件分（67.8%）のデータについて疑義の原因が明らかとなった。明らかになった原因は合計 147 件で、もっとも多かった原因は「システム設定間違い」70 件であった。中でも ST 合剤および β -ラクタム/ β -ラクタマーゼ阻害剤の合剤の MIC 値の設定間違いが多かった。

JANIS 検査部門では疑義のある MIC 値が報告された場合、警告を出すシステムが準備されているが、今回の検討によって、現在設定されている条件に加えて、1. 2 のべき乗でない MIC 値が報告された場合。ただし、薬剤感受性検査測定法コードが Etest に設定されているデータは除外、2. ST 合剤の MIC 値が 2 のべき乗で報告された場合の 2 つの条件についても追加する必要があると考えられた。

研究協力者

山岸 拓也 （国立感染症研究所 細菌第二部）
筒井 敦子 （同上）

A. 研究目的

厚生労働省が主体となって行っている院内感染対策サーベイランス（JANIS）は平成 19 年 7 月に従来行われていたサーベイランスから、参加医療機関で実用的かつ効果的なサーベイランスを目指し、大幅なシステムの切り替えを行った。

データの精度管理はサーベイランスの質を担保するために最も重要な作業の一つであるため、事務局が主体となって行っている。検査部門は各参加医療機関の細菌検査システムのデータを参加医療機関自身が JANIS 検査部門データフォーマット¹⁾に変換し、web 上でアップロードする必要がある。このため各医療機関で準備した提出用データフォーマットの設定が間違っている可能性や薬剤感受性検査結果の誤入力の可能性を

精度管理する必要がある。

精度管理については人的、時間的制約が多い中で効率的に行う必要がある。薬剤感受性結果は各薬剤の最小発育阻止濃度（MIC）によって判定がなされるが、これまで精度管理は行われていなかった。通常、薬剤感受性検査の際使用する薬剤濃度は 2 のべき乗（例：0.5, 1, 2, 4）であるため、2 のべき乗でない MIC 値は間違った MIC 値の可能性がある。

本年度は疑義のある薬剤感受性判定の基礎データとなる MIC 値の精度管理基準を作成することを目的とする。

B. 研究方法

研究の対象は JANIS 検査部門参加医療機関から 2009 年 1 月 1 日～12 月 31 日に提出されたすべてのデータのうち、薬剤感受性検査を行っているデータとした。薬剤感受性検査を行っているデータの中で疑義のあるデータを抽出するため、以

下の条件に合致するデータは正しい MIC 値が報告されていると考えられるため、検討から除外した。

1. MIC 値が 2 のべき乗で報告されたデータ (例: 0.5, 2, 4)
2. 薬剤感受性検査測定法コードが Etest を意味する「41」に設定されたデータ
3. サルファメトキサゾール/トリメトプリム (ST 合剤) の MIC 値が 10×2^n (例: 20, 40, 80) で報告されたデータ

疑義のあるデータを提出した参加医療機関の担当者に対し、電子メールを用いて原因を確認した。

<倫理面への配慮>

本研究はヒトゲノムを扱わない。また使用するデータに個人情報に含まれない。

JANIS 検査部門データを利用するため、統計法 (平成 19 年法律第 53 号) 第 33 条の規定に基づき、厚生労働省に調査票情報の提供の申出し、承認を受けた上で情報の提供がなされた。

C. 研究結果

232 医療機関から提出された 84,123 件が疑義のあるデータと考えられた。

電子メールで回答があった医療機関数は 131 医療機関 (56.5%) であり、84,123 件中 67.8% にあたる 57,046 件分の疑義のあるデータに該当した。医療機関への問い合わせから、疑義の原因は 147 件明らかとなり、1 医療機関あたり 1 ~ 4 種類の原因が認められた。

原因の内訳

もっとも多かった理由はアップロードされたデータが検査部門のデータフォーマットに準じていない (「システムの設定間違い」) が 70 件で、明らかとなった原因 147 件の 47.3% を占めた。以下多かった理由順に、手入力等による入力間違いで 53 件 (36.1%)、細菌検査システムの性能試験のために使用したデータを誤ってアップロードしたものが 5 件 (3.4%)、原因不明は 10 件 (6.8%) であった。通常、薬剤感受性検査の際、使用する薬剤濃度は 2 のべき乗であるが、参加医

療機関の中には 2 のべき乗以外の濃度 (例えばバンコマイシンの黄色ブドウ球菌に対する MIC 値: 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ など) を測定している場合があった。このような例が、今回の調査では 9 例 (6.1%) を占めた (表 1)。

原因として 70 例と最も多かった「システムの設定間違い」の内訳は、 β -ラクタム/ β -ラクタマーゼ阻害剤や ST 合剤等の合剤の設定間違いが 22 例、Etest により MIC を計測しているにも関わらず、薬剤感受性検査測定法コードが Etest に設定されていなかった例が 18 件、MIC 値を入力する該当箇所にディスク法により測定した阻止円径を入力していた例が 15 例、その他のシステム設定間違いが 15 例認められた。

D. 考察

今回の調査によって、疑義のある MIC 値が提出された原因が明らかとなり、「システムの設定間違い」が最も多く、47% を占めていた。「システムの設定間違い」の中でシステムの設定に問題があったが、詳細な原因の報告がなかったものが 23,856 件と最も多かったが、該当するデータを送信した医療機関の薬剤感受性データを調べたところ、15 医療機関中 13 医療機関は ST 合剤および β -ラクタム/ β -ラクタマーゼ阻害剤の合剤の設定間違いと推察された。

人為的な原因である入力ミスも 53 件の報告があり、全体の報告件数 (147 件) の 36.1% を占めており比較的多くの医療機関で発生していることが明らかとなった。しかし、人為的な原因である入力ミスを犯している医療機関は多いものの、疑義データの総数に占める割合は「システムの設定間違い」が 52,265 件で全体に占める割合は 91.6% であり、人為的な原因である入力ミスは 180 件で全体に占める割合はわずかに 0.3% であった。このことから、「システムの設定間違い」を今後減らすことが、MIC 値に関する精度向上に最も寄与すると考えられる。

「システムの設定間違い」の原因として ST 合剤および β -ラクタム/ β -ラクタマーゼ阻害剤の合剤の設定間違いが多かった。ST 合剤については、サルファメトキサゾールとトリメトプリムの MIC 値の合計を報告する必要があるが、医療機関によってはどちらか一方の薬剤の MIC 値のみを

報告していることがある。トリメトプリムの MIC 値（この値は2のべき乗：2, 4, 8となる）しか表示ができない場合は MIC 値変換プログラムを用意しており、これを利用することによって JANIS 検査部門用の値に変換することができる。またサルファメトキサゾールの MIC 値しか表示できない場合もあるが、この場合はセンター側で自動的に JANIS 検査部門用の値に変換され解析される。これらの現状を鑑みると、ST 合剤についてはトリメトプリムの MIC 値のみ報告している医療機関に MIC 値変換プログラムの周知を徹底することが必要であると考えられる。疑義のあるデータの条件として、ST 合剤については2のべき乗で報告されたデータが該当すると考えられる。

JANIS 検査部門にデータを送った際、誤った可能性のあるデータを自動的に判定するシステムがある。「MIC 値のエラー」という項目があるが、現在は MIC 値が 1024 µg/ml を超えた時にのみエラーが出るよう設定されている。今回の研究結果をふまえて新たなエラーの設定を追加する必要があると考えられる。

E. 結論

疑義のある MIC 値の設定条件を以下に定め、該当するデータが送信された場合は「MIC 値のエラー」として参加医療機関に確認を促す必要があると考えられる。

条件 1

2のべき乗でない MIC 値が報告された場合。

ただし、

薬剤感受性検査測定法コードが Etest を意味する「41」に設定されたデータは除外。

条件 2

ST 合剤の MIC が2のべき乗で報告された場合

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 26 回日本環境感染学会

シンポジウム 25 耐性菌の基礎から疫学まで
我が国における薬剤耐性菌の疫学

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

参考文献

1) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業
ホームページ 検査部門

<http://www.nih-janis.jp/section/kensa.html>

表 1

疑義のある薬剤感受性結果と判定されたデータの送信原因

原因の種類	報告医療機関数(%)	報告データ数(%)
システムの設定間違い	70 (47.6)	52,265 (91.6)
Etest の設定	18 (12.2)	2,417 (4.2)
ST 合剤の設定	14 (9.5)	15,239 (26.7)
β-ラクタム/β-ラクタマーゼ阻害剤の合剤の設定	8 (5.4)	3,765 (6.6)
阻止円径の入力	15 (10.2)	6,988 (12.2)
詳細不明*	15 (10.2)	23,856 (41.8)
入力間違い	53 (36.1)	180 (0.3)
テストデータの送信	5 (3.4)	46 (0.1)
正しい MIC 値	9 (6.1)	4,214 (7.4)
原因不明	10 (6.8)	341 (0.6)
合計	147	57,046

*システムの設定に問題があるが、原因の詳細が報告されなかったもの

新型の薬剤耐性菌の分子機構の解析

研究分担者 荒川 宜親 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨 16S rRNA methyltransferase NpmA は、16S rRNA をメチル化することにより、細菌にアミノグリコシド耐性を付与する酵素である。本研究では、NpmA の詳細な機能を明らかにするために、X 線結晶構造解析を行った。その結果、2.0Åの分解能で構造を決定することができた。NpmA は 10 個の α -helix と 9 個の β -strands で構成され、Rossmann-fold 様構造をしていた。活性中心には1分子の S-adenosyl-L-homocysteine(SAH)が結合していた。メチル基転位活性を中心に担うアミノ酸は 107 番目および 197 番目のトリプトファンであると予測され、実際にこれら2つのアミノ酸をアラニンに置換すると、NpmA のメチル基転位活性は完全に失われた。本研究により得られた構造情報は、16S rRNA MTase を不活化する阻害剤開発等への応用が期待できる。

研究協力者

和知野純一(国立感染症研究所 細菌第二部)

森茂太郎(同上)

柴山恵吾(同上)

山口佳宏(熊本大学環境安全センター)

黒崎博雅(熊本大学生命科学研究部)

A. 研究目的

16S rRNA methyltransferase (以下 MTase)は 16S rRNA 内の塩基をメチル化することで、アミノグリコシド耐性を付与する酵素である。今日では、これら 16S rRNA MTase を産生することでアミノグリコシド耐性を獲得した病原細菌が医療環境のみならず、畜産現場からも分離されるようになり、その蔓延が危惧されている。このような耐性菌を制御・抑制するための一つの手段が分子構造に基づいた特異的阻害剤の開発である。本研究では、16S rRNA MTase の機能を抑制するための阻害剤開発の一助として、16S rRNA MTase NpmA の X 線結晶構造解析を行った。

B. 研究方法

NpmA の発現・精製: *npmA* 遺伝子を pCold-IV に連結し、*E. coli* BL21(DE3)pLysS に導入した。IPTG による誘導後、菌体を回収し、フレンチプレスで破碎を行った。超遠心後の上清を His trap カラムに通し、イミダゾールで目的蛋白を溶出した。溶出された蛋白をゲルろ過カラムでさらに精製した。最終的に 8mg/ml の蛋白濃度とし、結晶化のための試料とした。

結晶化: 結晶化の初期条件は市販のスクリーニングキットを用いて検討した。最終的にリザーバー溶液として、0.1 M citric acid (pH4.5), 30% PEG6K buffer を用いた。20°Cのインキュベーション1週間で構造解析に至適な結晶を得た。

X線測定: X線測定は Photon Factory にて行った。位相決定は重原子同型置換法にて行った。

補因子結合体の作製: S-adenosyl-L-homocysteine を 0.4 mM になるようにリザーバー溶液に溶解した。溶解液に native crystal を浸潤し、補因子結合体を作製した。

アラニン置換体の作製: 部位特異的変異導入法を用いて、アラニン置換体を作製した。

薬剤感受性試験: 寒天平板希釈法にて

Kanamycin B および Neomycin の MIC を測定した。

メチル基転位活性の測定: 精製酵素、30S ribosomal subunit、 $[^3\text{H}]$ S-adenosyl-L-methionine を混和し、メチル基の転位活性を測定した。

C. 結果

作製した NpmA の結晶を図 1 に示す。本結晶を用いて 2.0 Å 分解能で構造を決定した(表 1)。NpmA の全体像を図 2 に示す。NpmA は 10 個の α -helix と 9 個の β -strands で構成され、Rossmann-fold 様構造をしていた。 β -strands は $\beta 3\downarrow$ - $\beta 2\downarrow$ - $\beta 1\downarrow$ - $\beta 4\downarrow$ - $\beta 5\downarrow$ - $\beta 7\uparrow$ - $\beta 6\downarrow$ の順で並走し、他の SAM 依存性メチル化酵素と同様の構造をしていた。 $\beta 6$ と $\beta 7$ の間には α -helical cap 構造が存在した。

活性中心には 1 分子の SAH が結合していた(図 2)。SAH の結合には D30, N38, D55, A87, E88, L104, T109, S195 が関与していた(図 3)。したがって、メチル基供与体である SAM の結合もこれらのアミノ酸によって担われていると予測された。そこで、アラニン置換体を作製し、MIC およびメチル基転位活性の 2 つの指標により、それぞれのアミノ酸の役割を評価した。その結果、いずれのアラニン置換体も有意な MIC 低下を示さなかった(表 2)。しかし、メチル基転位活性測定においては D55A が有意な低下を示した(図 5A)。したがって、D55 位を介した SAM への結合は、NpmA が酵素活性を発揮する際に重要な結合であることがわかった。

また、SAH の上部には W107 および W197 が存在した(図 4)。これらはメチル化部位である 16S rRNA の A1408 位の認識に重要なアミノ酸であると予測された。そこで、前述と同様にアラニン置換体を作製し、MIC 及びメチル基転位活性を測定した。その結果、W107、W197 のいずれのアラニン置換体もアミノグリコシド耐性を付与することができず(表 2)、メチル基転位活性は完全に失われた(図 5B)。したがって、W107 および W197 が NpmA のメチル基転位活性に必須な部位であることがわかった。

さらに、R200、L201、R207 のアラニン置換体において、メチル基転位活性の低下がみられた(図 5C)。これらは全て α -helical cap 構造中に存在しており、W197 も含めて、この α -helical cap 構造には NpmA の酵素活性に重要なアミノ酸が多く含まれていることがわかった(図 6)。

D. 考察

本研究では NpmA の構造を 2.0 Å 分解能で決定することができた。NpmA は Rossmann-fold 様構造を含め他の SAM 依存性 MTase と共通の構造を持っていた。NpmA はこれまで構造が決定された細菌由来の rRNA MTase として最も小さく、構造相関解析から *B. subtilis* の tRNA MTase (TrmB) と最も相同性が高かった。また、多くの rRNA MTase が MTase ドメイン以外に N 末端もしくは C 末端に External ドメインを持つ一方、NpmA においてはこれらが欠損していることがあきらかとなった。

活性ポケットへの SAH の結合には、D30, N38, D55, A87, E88, L104, T109, S195 が関与していた。アラニン置換体の解析から D55 位を介した結合が特に重要な結合であることがわかった。D55 位は NpmA のみならず、多くの rRNA MTase で保存されている。したがって、D55 と補因子である SAH (もしくは SAM) のリボース部位との結合は rRNA MTase が補因子を活性ポケット中に安定化するのに普遍的に重要である可能性が示唆された。

W107 および W197 は SAH の上部で疎水ポケットを形成していた。変異体の解析結果から、これらの 2 つのトリプトファンは NpmA の酵素機能発揮に必須な部分であることがわかった。両側鎖のインドール環はメチル基の受容部位である A1408 位のアデニン環と π - π 相互作用を介して、結合するものと予測され、標的である A1408 位の認識に重要な役割を果たしているものと考えられた。これら 2 つのトリプトファンは NpmA のみならず、これまで報告された A1408 位をメチル化する全ての 16S rRNA MTase に保存されており(図 7)、その重要性は本酵素群全般にいえるものであると考えられた。

さらに、変異体解析の結果から、NpmA の酵素

機能に影響を与える部位として、R200, L201, R207 が挙げられた。これらのアミノ酸はその位置から、標的部位である A1408 もしくはその近傍の核酸に結合するものと予測され、NpmA の基質認識に補助的に関与しているものと考えられた。

E. 結論

NpmA の構造を 2.0Å 分解能で決定することができた。本研究成果は、16S rRNA MTase の阻害剤の分子設計を行う上で重要な知見を与えるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文(雑誌)発表:

なし

2. 学会発表:

1) 和知野純一, 山口佳宏, 森茂太郎, 黒崎博雅, 柴山恵吾, **荒川宜親**. アミノグリコシド耐性を付与する 16S rRNA Methyltransferase NpmA の構造機能解析. 第 39 回薬剤耐性菌研究会, 平成 22 年 11 月, 渋川

G. 知的所有権の出願・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

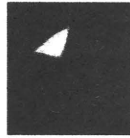


図1. NpmAの結晶

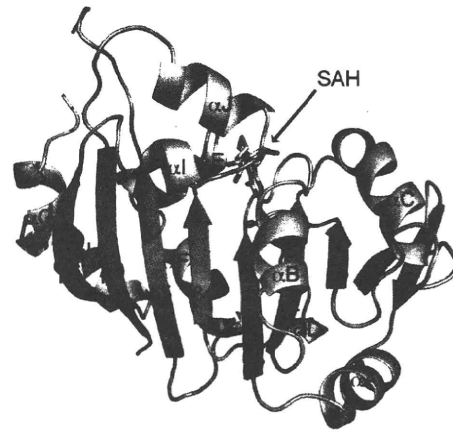


図2. NpmAの全体像

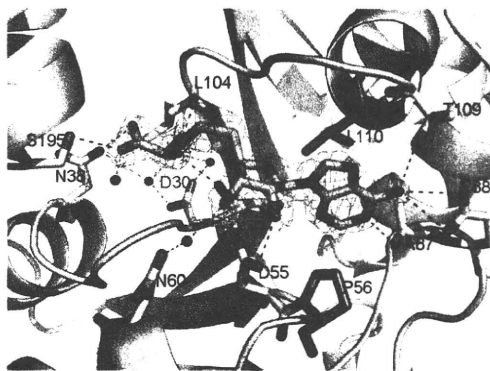


図3. SAH結合部位

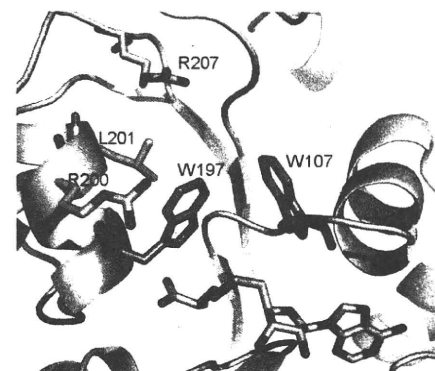


図4. NpmAの触媒部位

Table 1. Summary of crystallographic data, collection and refinement statistics

	NpmA-native	NpmA-SAH	Derivatives		
			Au1	Au2	Au3
Data collection					
Wavelength [Å]	1.0	1.0	1.0254	1.0390	1.0
Resolution range [Å]	50-2.00 (2.07-2.00)	50-2.00 (2.03-2.00)	50-2.60 (2.69-2.60)	50-2.60 (2.69-2.60)	50-2.10 (2.18-2.10)
Space group	<i>P4₁2₁2</i>	<i>P4₁2₁2</i>	<i>P4₁2₁2</i>	<i>P4₁2₁2</i>	<i>P4₁2₁2</i>
Cell dimensions					
<i>a</i> [Å]	61.7	62.0	61.6	61.8	61.7
<i>b</i> [Å]	61.7	62.0	61.6	61.8	61.7
<i>c</i> [Å]	110.0	110.7	110.1	110.1	110.1
No. of unique reflections	15032 (1452)	15264 (722)	12553 (1261)	12602 (1259)	13008 (1282)
Redundancy	14.0 (14.2)	13.8 (14.0)	7.5 (7.4)	7.5 (7.4)	25.9 (25.7)
Completeness [%]	100.0 (100.0)	99.9 (100.0)	99.9 (100.0)	99.9 (99.9)	100.0 (100.0)
<i>R</i> _{int} [%]	3.8 (17.6)	5.8 (29.3)	6.1 (14.7)	6.3 (14.9)	7.5 (23.6)
<i>I</i> σ(<i>I</i>)	66.2 (13.9)	68.1 (12.8)	49.8 (13.9)	53.5 (16.0)	78.2 (17.3)
MIRAS Phasing					
Heavy atom sites (acentric/centric)			2	2	2
Phasing Power			1.43:1.30	0.82:0.69	1.17:0.92
<i>R</i> -cullis (acentric/centric, isomorphous)			0.71:0.71	0.88:0.94	0.64:0.68
<i>R</i> -cullis (anomalous)			0.77	0.80	0.76
Mean overall figure of merit (after DM)					0.45
Refinement					
Resolution range [Å]		34.4-2.0			
<i>B</i> factors [Å ²]					
Average		29.4			
Protein		29.0			
Water		36.5			
<i>R</i> _w [%]		18.6			
<i>R</i> _{free} [%]		24.1			
No. of protein atoms		1833			
No. of water molecules		116			
Ramachandran plot					
In preferred region [%]		97.9			
In allowed region [%]		1.6			
Outliers [%]		0.5			
R.m.s.d bond length [Å]		0.017			
R.m.s.d bond angle [°]		1.6			

^a*R*_{avg} = $\frac{\sum_{hkl} \sum_j |I_j(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j I_j(hkl)}$, where *I*(*hkl*) is the observed intensity for reflection for *hkl* and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity calculated for reflection *hkl* from replicate data. ^b*R*_{calc} = $\frac{\sum_{hkl} |F_o|}{\sum_{hkl} |F_c|}$, where *F_o* and *F_c* are the observed and calculated structure factors, respectively. ^c*R*_{free} = $\frac{\sum_{hkl} |F_o| - F_{5\%}}{\sum_{hkl} |F_o|}$ for 5% of the data not used at any stage of structural refinement. ^dR.m.s.d: root-mean-square deviation. Values in parentheses are for the last resolution shell.

表1. NpmAの結晶学データ

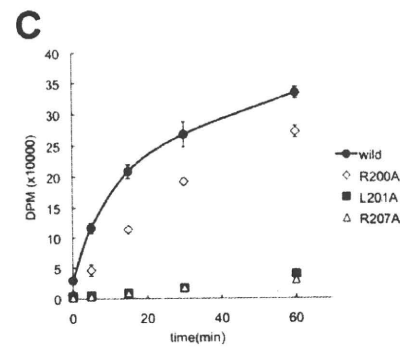
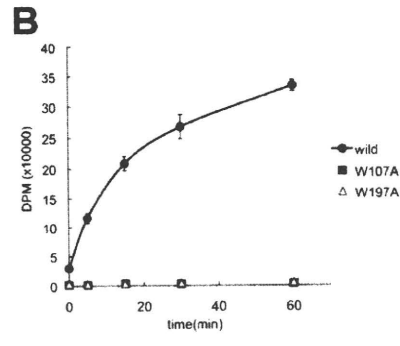
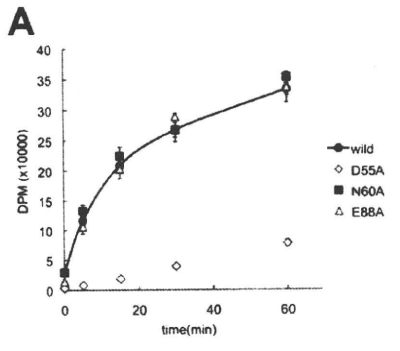


図5. NpmA変異体の酵素活性

Table 2. Results of susceptibility testing

NpmA variant	MIC (μg/ml)	
	Neomycin	Kanamycin B
NpmA wild-type (pMCL-BE)	64	256
empty vector (pMCL210)	1	1
Residues bound to SAH		
D55A	64	256
N60A	64	256
E88A	32-64	128-256
T109A	64	256
S195A	64	256
Residues for recognizing A1408		
W107A	1	1
W197A	1	1
Residues bound to 16 S rRNA or 30 S subunits		
R37A	64	256
K67A	64	256
K74A	64	256
Y141A	64	256
Y145A	64	256
E149A	64	256
K151A	64	256
R200A	64	256
L201A	32-64	128-256
R205A	64	256
R207A	32-64	128-256

表2. NpmA変異体のMIC

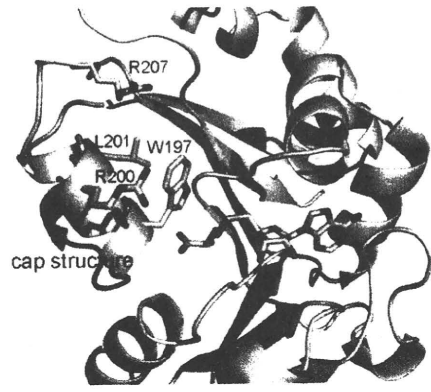


図6. NpmAのα-helical cap structure

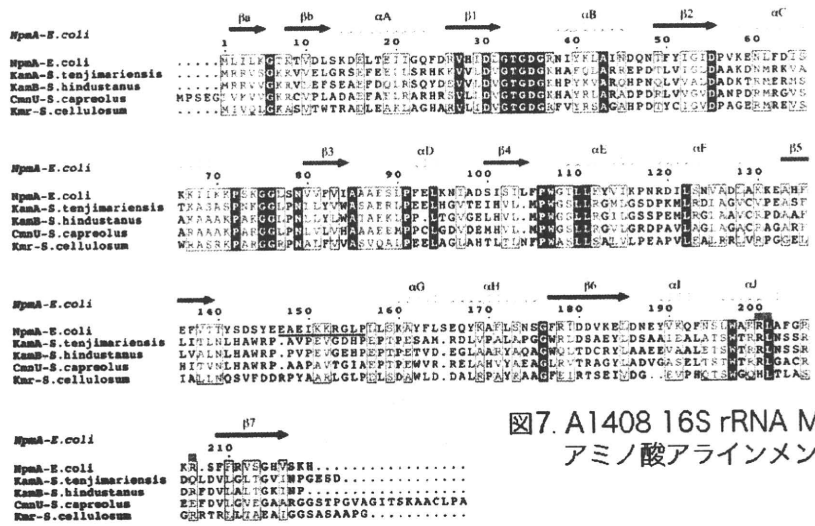


図7. A1408 16S rRNA MTaseグループのアミノ酸アラインメント

日本国内で分離された *Acinetobacter baumannii* の分子疫学的解析

研究分担者 荒川 宜親 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨

近年、世界中でアシネトバクター属、特に *Acinetobacter baumannii* による感染症の増加と急速な多剤耐性化が進んでいる。本研究は、わが国で分離されたアシネトバクター属の分子疫学的性状を検討した。

2000年から2008年にわが国で分離されたアシネトバクター属のうち、重複株を除いた59株を対象にカルバペネム耐性遺伝子の型別、菌種の再同定、Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析を行った。イミペネム非感性 (MIC; $\geq 8\mu\text{g/mL}$) であった26株のうち、24株はメタロ- β -ラクタマーゼ産生株であった。*A. baumannii* は59株中21株 (35.6%) のみと諸外国の報告に比べると少なく、*A. genomic species 3* が23株、*A. genomic species 13TU* が15株含まれていた。また、*A. baumannii* 21株のうち6株がイミペネム非感性であった。IMP-1型メタロ- β -ラクタマーゼ産生の4株全てがMLST解析で新規のシーケンスタイプ(ST)であった一方で、2株はOXA型 β -ラクタマーゼ産生株であり世界流行株とされる clonal complex 92 に属していた。

メタロ- β -ラクタマーゼ産生 *A. baumannii* は全て新規 ST であり日本固有の株の存在が示唆された。一方で、カルバペネム耐性の世界流行株も国内に存在しており、今後の広がりには注意が必要と考えられる。

研究協力者

松井真理(国立感染症研究所 細菌第二部)
山根一和(同上)
鈴木里和(同上)
和知野純一(同上)

本研究では、わが国で分離されたアシネトバクター属の分子疫学的性状を明らかにする目的で、カルバペネム耐性遺伝子の型別、菌種の再同定、MLST 解析を行った。

A. 研究目的

アシネトバクター属は、日和見感染症の原因菌であり、世界中でアシネトバクター属、特に *Acinetobacter baumannii* による感染症の増加とその多剤耐性化が急速に進んでいる。近年、海外では Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析で clonal complex 92 に属する特定の遺伝子型の株が広がっていることが報告されている。一方、日本では多剤耐性アシネトバクター属の分離率は低く、分子疫学的な解析データも少ない。

B. 研究方法

菌株: 2000年から2008年にかけてわが国の18都府県の医療機関で分離されたアシネトバクター属106株。

薬剤感受性試験: 薬剤感受性試験はCLSI(米国臨床検査標準委員会)が推奨する方法に準拠し、寒天平板希釈法にて実施した。

菌種の同定: アシネトバクター属の同定は、Vitek2 compact (bioMérieux) により行った。菌種の分類は、既報に従い16S-23S rRNA intergenic region 領域の制限酵素切断パターン(MboI 及び

AluI)及び16S rRNA 遺伝子の制限酵素切断パターン(MboI)により決定した。各菌種のバンドパターンは、対照株(*A. baumannii*; ATCC19606、*A. calcoaceticus*; ATCC23055、*A. genomic species* 3; ATCC19004、*A. genomic species* 13TU; ATCC17903)と比較し判定した。

PFGE:制限酵素 SmaI 消化 DNA の PFGE 解析には CHEF Mapper system (BioRad)を用いた。

カルバペネム耐性遺伝子の型別:既報に従い、メタロ-β-ラクタマーゼ (*bla*_{IMP-1}、*bla*_{IMP-2}、*bla*_{VIM-2})、OXA 型 β-ラクタマーゼ (*bla*_{OXA-51-like}、*bla*_{OXA-23-like}、*bla*_{OXA-58-like}、*bla*_{OXA-24-like})を PCR 法にて検出した。

メタロ-β-ラクタマーゼ産生の確認(SMA ディスク法):メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤であるメルカプト酢酸ナトリウム(SMA; sodium mercaptoacetic acid)の影響で、セフトジジム(CAZ)及びイミペネム(IPM)の阻止円が拡大した株を、メタロ-β-ラクタマーゼ産生株と判定した。

MLST:既報に従い実施した。7種のハウスキーピング遺伝子 *gltA*、*gyrB*、*gdhB*、*recA*、*cpn60*、*gpi*、*rpoD* の PCR 産物をシーケンス解析した。Allelic profile 及びシーケンスタイプ(ST)の決定は、*Acinetobacter baumannii* MLST database (<http://pubmlst.org/abaumannii/>)により行った。

(倫理面への配慮)

本研究は分離菌株についての解析であり、ヒト由来の臨床材料を使用しない。また、菌が分離された患者の診療情報を扱わない。したがって、倫理上特段の問題点は発生しない。

C. 結果

Vitek2 compact によりアシネトバクター属(機器による同定菌種名は *A. baumannii*)と同定された106株の菌種同定を行った結果、*A. baumannii* が58株、*A. genomic species* (gen. sp.) 3が23株、*A. gen. sp.* 13TU が20株、*A. junii* 1株、*A. radioresistens* 1株、いずれの対照株のバンドパターンとも一致しない同定不能株3株であった。

PFGE を行い、重複株を排除した59株を解析した。

26株は、イミペネムの最小発育阻止濃度(MIC)が8μg/mL以上であり、CLSIの基準で耐性(R)あるいは中間(I)と判定された。そのうち24株はいずれも、SMA ディスク法陽性であり、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を保有していた(表1)。59株の菌種内訳は、*A. baumannii*が21株(35.6%)のみであり、*A. gen. sp.* 3が23株、*A. gen. sp.* 13TU が15株含まれていた。

A. baumannii 21株は、全て *bla*_{OXA-51-like} 遺伝子陽性であった(表2)。プロモーター配列を含む挿入配列 *ISAbal* が *bla*_{OXA-51-like} 遺伝子上流に挿入された OXA-51-like β-ラクタマーゼ産生株は6株のみであり、イミペネムの MIC は 0.5μg/mL から16μg/mL と幅広い値を示した(表1)。また、*bla*_{OXA-23-like} 遺伝子陽性株も、その上流に *ISAbal* 配列を有しており、OXA-23-like β-ラクタマーゼ産生が示唆された。メタロ-β-ラクタマーゼ産生株、OXA-23-like β-ラクタマーゼ産生株は、いずれもイミペネムの MIC が 32μg/mL-64μg/mL であり、耐性(R)と判定された(表1)。

A. baumannii 21株のカルバペネム耐性遺伝子、薬剤感受性試験結果及び Multilocus Sequence Typing (MLST) 結果を表3に示す。*で示した12の新規のシーケンスタイプ(ST)を同定した。一方で、8株は世界中で分離報告のある clonal complex 92(CC92)に属した。メタロ-β-ラクタマーゼ産生株は、4株全てが新規STに属したのに対して、OXA 型 β-ラクタマーゼ産生株 (*ISAbal-bla*_{OXA-51-like}、*ISAbal-bla*_{OXA-23-like})はいずれも CC92 に属した。イミペネム(IPM)、アミカシン(AMK)、シプロフロキサシン(CIP)の三系統全てに耐性の多剤耐性株は、菌株番号 09-642 と 09-775 の2株であり、全く異なる遺伝子型の株であった。

D. 考察

本研究で解析したアシネトバクター属59株のうち特に注意が必要とされる *A. baumannii* は、21株(35.6%)のみであった。諸外国では、臨床分離ア

シネトバクター属の70%以上が *A. baumannii* と報告されており、わが国のその割合は低いと考えられた。自動検査機器等を用いた生化学的性状による菌種の同定方法では、アシネトバクター属の種の分類は困難であり、全て *A. baumannii* と報告されることも多いため、データの解釈には注意が必要である。アシネトバクター属の中でも、*A. baumannii* のみが染色体上に *bla*_{OXA-51-like} 遺伝子を有すると既に報告があるが、本研究でも同様の結果が得られた(表 2)。これらの情報をもとに、今後、*A. baumannii* の簡易同定方法の確立を目指す予定である。

本研究で解析したアシネトバクター属のカルバペネム耐性は、メタロ-β-ラクタマーゼ産生によるものが多かった。諸外国では、*A. baumannii* のカルバペネム耐性は OXA 型 β-ラクタマーゼ産生によるものが、*A. baumannii* 以外のアシネトバクター属のカルバペネム耐性はメタロ-β-ラクタマーゼ産生によるものが比較的多いと報告がある。わが国では、*A. gen. sp. 3* や *A. gen. sp. 13TU* のみならず *A. baumannii* のカルバペネム耐性もメタロ-β-ラクタマーゼ産生によるものが多かった。これらカルバペネム耐性 *A. baumannii* は海外で少ないメタロ-β-ラクタマーゼを産生することに加え、海外で報告のない新規 ST であったことから、日本固有の株である可能性が示唆された。一方で、OXA 型 β-ラクタマーゼ産生株は、世界中で分離報告のある CC92 に属した。今後、わが国の臨床現場で分離される菌株の疫学的解析をさらに進めるとともに、世界流行株とされる CC92 に属する *A. baumannii* の簡易同定方法を検討していきたい。

E. 結論

わが国で分離されたアシネトバクター属のうち、*A. baumannii* の割合は 35.6%と低いことが示唆さ

れた。日本固有の遺伝子型の株が同定された一方で、OXA 型 β-ラクタマーゼを産生する海外流行株が既に国内に存在することも明らかとなった。今後の臨床現場でこれら世界流行株の広がりも懸念され、注意が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文(雑誌)発表:

なし

2. 学会発表:

- 1) M.MATSUI, S.SUZUKI, K.YAMANE, J.WACHINO, K.KIMURA, A.TSUTSUI, T.YAMAGISHI, T.KONDA, Y.ARAKAWA Multilocus Sequence Typing (MLST) of *Acinetobacter baumannii* Isolated in Japan. 50th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Sep 2010, Boston
- 2) 松井真理, 鈴木里和, 山根一和, 和知野純一, 荒川宜親. 日本国内の医療機関で分離された *Acinetobacter baumannii* の分子疫学的解析. 第 39 回薬剤耐性菌研究会, 平成 22 年 11 月, 渋川
- 3) 松井真理, 鈴木里和, 山根一和, 荒川宜親. 日本で分離されたアシネトバクターの分子疫学的解析. 第 22 回臨床微生物学会総会, 平成 23 年 1 月, 岡山

H. 知的所有権の出願・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