

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、IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ(以下、IMP-1 と略す)の複核金属イオン活性中心部位における金属イオン選択性とチオール化合物の IMP-1 に対する阻害機構を明らかにする目的で分光学的サイレントな Zn(II)を Co(II)で置換した金属置換 IMP-1 酵素を調製し、その分光学的検討を行った。IMP-1 のアポ酵素(以下、アポ IMP-1 と略す)に 1 当量の Zn(II)と 1 当量の Co(II)を添加すると、二つの金属配位部位(サイト 1 とサイト 2)で Zn(II)は Co(II)より親和性が高く、Zn(II)はサイト 2 よりサイト 1 との親和性が高いことがわかった。チオール化合物は、Co(II)置換 IMP-1 酵素(アポ IMP-1 に 2 当量の Co(II)を加えて調製したもの)の Co(II)にチオレート基が配位することがわかった。この結果から、IMP-1 の阻害剤であるチオール化合物は、Zn(II)を含むホロ酵素の場合にも活性中心の金属イオンへ配位することによって酵素活性を阻害することが示唆された。

本研究で得られた知見はメタロ-β-ラクタマーゼに対するさらに有効な阻害剤の開発を行う上で重要な知見を与えるものと考えられる。

研究協力者

山口佳宏 (熊本大学・環境安全センター)

A. 研究目的

β-ラクタマーゼは細菌の産生する酵素であり、ラクタム剤耐性菌の薬剤耐性の原因の一つである。β-ラクタマーゼは Ambler 等¹⁾によってアミノ酸配列相同性にに基づき、クラス A~D に分類される。クラス A, C, D β-ラクタマーゼは活性中心部位にセリン残基を含み、一方、クラス B β-ラクタマーゼは活性中心部位に 1 個または 2 個の Zn(II)を要求することからメタロ-β-ラクタマーゼと呼ばれている。メタロ-β-ラクタマーゼはカルバペネム薬を含むほとんど全てのβ-ラクタム剤を加水分解し、かつ、現在臨床で使われているクラブラン酸やスルバクタム等のβ-ラクタマーゼ阻害剤に対して感受性を示さない。

メタロ-β-ラクタマーゼの中でも IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼ(以下、IMP-1 と略す)の遺伝子(*bla_{IMP}*)は、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。²⁾そのため、水平的に他の細菌に伝播することができ、日本のみならずヨーロッパでも IMP-1 の単離が報告されている。³⁾また、IMP-1 はメタロ-β-ラクタマーゼの中でもカルバペネム薬を効率よく加水分解するので、

IMP-1 を保持した病原菌の蔓延が危惧されている。

2000 年に *Pseudomonas aeruginosa* 由来の IMP-1 の三次元構造が報告された。⁴⁾その全体構造はαβ/βαのサンドイッチ構造をとり、β-シートの浅くて広い溝に 2 個の Zn(II)が存在する。活性中心部位の構造を図 1 に示す。第一の Zn(II) (Zn1)には 3 つのヒスチジン(His116, His118, His196)が配位し、第二の Zn(II) (Zn2)にはアスパラギン酸(Asp120)、システイン(Cys221)、ヒスチジン(His263)と水分子(Wat)が配位している。今までに知られているメタロ-β-ラクタマーゼの X 線結晶構造では、水分子(またはヒドロキシアニオン)が Zn1 と Zn2 に架橋して配位しているが、この IMP-1 の三次元構造では観測されていない。

我々はこの数年、IMP-1 に対する阻害剤の開発を行ってきた。この過程で、メルカプト酢酸や 2-メルカプトプロピオン酸をはじめとするチオール化合物が IMP-1 を阻害することを見出した。⁵⁾

荒川等は、メルカプト酢酸ナトリウムディスク(SMA)とセフトジジム(CAZ)のディスクとを並置し、ディスク周辺の発育阻止帯の変化からメタロ-β-ラクタマーゼの産生菌の有無を迅速かつ簡便に識別するダブルディスク法を開発している。⁶⁾

本研究では、我々が既に確立したメタロ-β-ラクタマーゼのアポ酵素の調製法に従って IMP-1 のアポ酵素(以下、アポ IMP-1 と略す)を調製し、分光学的にサイレントな Zn(II)を Co(II)で置換した金属酵素の二つの金属イオン配位部位における金属イオン選択性について分光学的に検討した。さらに、チオール化合物の阻害が IMP-1 の活性中心部位の金属イオンへの配位によることを明らかにする目的で Co(II)置換 IMP-1 とメルカプト酢酸ならびに 2-メルカプトエタノールとの相互作用を分光学的に検討した。

B. 研究方法

1. アポ IMP-1 の調製

アポ IMP-1 の調製に用いた器具および緩衝液は全て Riordan 等の方法⁷⁾により脱金属処理し、我々の方法に従ってアポ IMP-1 (25% グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl)緩衝液)を調製した。

2. Co(II)置換 IMP-1 の可視・紫外吸収スペクトル

B.1.で調製した 150 μM アポ IMP-1 溶液 200 μL に 25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl)緩衝液に溶かした CoSO₄ を 0.2 当量ずつ(1 μL)加え、室温・窒素下で 290~800 nm の吸収スペクトルを光路長 1 cm のマイクロセルを用いて測定した。これを酵素 1 分子当たり Co(II) 2 当量まで繰り返した。

3. 二種類の金属イオンで置換したアポ IMP-1 の可視・紫外吸収スペクトル変化

178 μM アポ IMP-1 溶液 200 μL に 25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl)緩衝液に溶かした CoSO₄ を 0.2 当量ずつ(1 μL)を加え、室温・窒素下で 290~800 nm の吸収スペクトルを光路長 1 cm のマイクロセルを用いて測定した。これを酵素 1 分子当たり Co(II) 1 当量まで繰り返した。次いで、25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl)緩衝液に溶かした Zn(NO₃)₂ を 0.2 当量ずつ(1 μL)加え、室温・窒素下で 290~800 nm の吸収スペクトルを測定した。これを酵素 1 分子当たり Zn(II) 2 当量まで繰り返した。また、同様の方法で 1 当量添加後、Co(II) 2 当量まで添加し吸収スペクトルを測定した。

4. Co(II)置換 IMP-1 と阻害剤・チオール化合物の可視・紫外吸収スペクトル変化

B.2.で述べた方法に従って調製した 168~171 μM Co(II)置換 IMP-1 溶液 200 μL に

25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl)緩衝液に溶かしたチオール化合物を 0.2 当量ずつ(1 μL)加え、室温・窒素下で 290~800 nm の吸収スペクトルを光路長 1 cm のマイクロセルを用いて測定した。これを酵素 1 分子当たりチオール化合物 2 当量まで繰り返した。チオール化合物としてメルカプト酢酸と 2-メルカプトエタノールを用いた。

コントロール実験として、25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl)緩衝液に溶かした 180 μM CoSO₄ 溶液 200 μL に、25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl)緩衝液に溶かしたメルカプト酢酸を 0.5 当量ずつ(1 μL) 2 当量まで加え同様に吸収スペクトルを測定した。

C. 研究結果と考察

1. Co(II)置換 IMP-1 の性質

Zn(II)酵素は Zn(II) (3d¹⁰)が無色・反磁性であるため、分光学的にサイレントであり電子スペクトルや EPR 法によって研究できない。そのため、Zn(II)酵素では、酵素活性が保持される金属イオンに置換し、活性部位のキャビティーに関与する残基や金属イオン周辺の構造を特徴づける方法がよく使われる。その中でも Co(II)は Zn(II)と配位化学が似ており 0.62 Å と 0.64 Å という同程度のイオン半径をもつことから置換金属イオンとしてよく用いられている。⁸⁾

本研究では、まず、アポ IMP-1 を調製し、このアポ酵素と Co(II)との分光化学的特性について検討することにした。アポ IMP-1 に Co(II)を 0.2 当量ずつ 2 当量まで添加した時の可視・紫外吸収スペクトル変化を図 2A に示す。図 2A の実線の矢印に示すように Co(II)を添加していくと 350, 525, 612, 639 nm に吸収が現れた。これらの吸収は加えた Co(II)濃度の増加に伴って増大し、Co(II) 2 当量で吸収はほぼ変化しなくなった。しかしながら、350 nm と 525-639 nm の吸収のいずれかが優先的に出現することはなかった。350 nm の吸収はチオレートから Co(II)への電荷移動吸帯(LMCT バンド: ligand-to-metal charge transfer band)であると考えられることから C221 残基のチオレート(図 1 参照)の Co(II)への配位を示している。

前述したように、IMP-1 は酵素 1 分子当たり 2 個の Zn(II)を活性中心部位に有している(図 1)。アポ IMP-1 に金属イオンが結合しうる部位は 3 個のヒスチジン(His116, His118, His196)と架

橋する水分子が配位するサイト1とアスパラギン酸(Asp120)、システイン(Cys221)、ヒスチジン(His263)、水分子(Wat)と架橋水分子が配位するサイト2がある(図1参照:ただし、IMP-1のX線結晶構造では二つのZn(II)を架橋している水分子の電子密度は観測されていない。)

Co(II)のアポIMP-1への分光滴定実験から、1当量と2当量のCo(II)を添加した時の350 nmのLMCTバンドのモル吸光係数(ϵ)は、それぞれ約390と約1100 $M^{-1}cm^{-1}$ であると見積もられる。ここで2当量のCo(II)の添加によってCo(II)がサイト1とサイト2(図1を参照)を完全に占有しているとすれば、モル吸光係数の値から判断すると1当量のCo(II)のアポIMP-1への添加においては、Co(II)はサイト1とサイト2を2:1の比で分布していると推定される。

2. 二種類の金属イオン(Zn(II)とCo(II))で置換したアポIMP-1の可視・紫外吸収スペクトル

次に、サイト1とサイト2へのZn(II)とCo(II)の金属イオン選択性について検討した。

アポIMP-1にCo(II) 1当量、次でZn(II) 1当量をそれぞれ0.2当量ずつ、逐次的に添加した際の吸収スペクトル変化を図2Bに示す。Co(II)を1当量まで添加すると350 nmと525, 612, 639 nmに吸収がみられるようになった。次に、Zn(II)を1当量添加すると350 nmの吸収は増大し、525-639 nmの吸収にはあまり変化がみられなかった。さらに2当量のZn(II)を加えると350 nmと525-639 nmの吸収はZn(II)濃度の増加とともに消失した(図2C)。これは活性中心部位にCo(II)に替わりZn(II)が配位していることを示している。また、1当量のZn(II)の添加で350 nmの吸収が増加したのは(図2B)、Zn(II)はサイト1に優先的に結合し、サイト1に配位していたCo(II)がZn(II)に押し出されサイト2へ移動したことを示している。

また、過剰のZn(II)を加えることで全ての吸収が消失したことから(図2C)、サイト2においてもCo(II)よりZn(II)の親和性が高いことがわかった。

図2DにアポIMP-1にZn(II) 1当量、次いでCo(II) 2当量をそれぞれ0.2当量ずつ逐次的に添加した際の吸収スペクトル変化を示す。Zn(II) 1当量までの添加では吸収スペクトル変化は見られなかった。次に、1当量のCo(II)を添加すると350 nmと525-639 nmの吸収は増加した。さらにCo(II)を2当量まで添加すると525-639 nmの吸収は若干増加した。一方、350 nmの吸収の増加は525-639 nmのそれに比べ

大きく、このときのスペクトルは図2Bの最終のスペクトルと一致した。

1当量のZn(II)をアポIMP-1に添加した後、引き続き1当量と2当量のCo(II)を添加した際の350 nmのLMCTバンドのモル吸光係数(ϵ)は、それぞれ730と900 $M^{-1}cm^{-1}$ であった。これらの値は、アポIMP-1に2当量のCo(II)を添加した時(図2Aの最終のスペクトル)のモル吸光係数($\epsilon = ca. 1100 M^{-1}cm^{-1}$)の値よりも小さい。このことは、1当量のZn(II) (mono-Zn(II)-IMP-1: 図3)はCo(II)の添加前に既にある割合でサイト1とサイト2へ分布していることを示している。

Co(II)置換IMP-1の吸収スペクトル変化から提案されるIMP-1の金属置換酵素モデルを図3に示した。

3. Co(II)置換IMP-1とチオール化合物の可視・紫外吸収スペクトル変化

以前、我々はIMP-1がチオール化合物によって阻害されることを報告した。⁵⁾本研究では、メルカプト酢酸と2-メルカプトエタノールのチオール基が活性中心部位の金属イオンへ配位することによって酵素阻害することを明らかにする目的で以下の検討を行った。

アポIMP-1に2当量のCo(II)を添加すると図4~図5の実線の矢印の変化を示す。さらにメルカプト酢酸(図4)または2-メルカプトエタノール(図5)を0.2当量ずつ2当量まで添加すると図中の点線の矢印のように変化した。メルカプト酢酸添加では、350 nmの吸収が増大し、555, 597, 635 nmに吸収が現れた。そこで350 nmと650 nmにおける吸光度を[加えたメルカプト酢酸濃度]/[Co(II)置換IMP-1濃度]に対してプロットした(図3, inset)。ここでの吸光度は、メルカプト酢酸をCo(II)置換IMP-1(2当量のCo(II)を含む)に添加した時の吸光度からアポIMP-1の吸光度とCo(II)置換IMP-1(2当量のCo(II)を含む)の吸光度を差し引いたもので表している。メルカプト酢酸濃度の増加に伴って吸光度は増加していくき、[メルカプト酢酸濃度]/[Co(II)置換IMP-1濃度]の濃度比が1を超えると次第に飽和する現象が観測された。

この結果から、メルカプト酢酸 + Co(II)置換IMP-1 \rightleftharpoons メルカプト酢酸-Co(II)置換IMP-1のように1:1のone-step binding modelで反応すると仮定してDynaFitプログラム⁹⁾を用いて解析すると解離定数 K_d は14 μM であると見積もられた。

一方、2-メルカプトエタノールの添加では、

350 nm の吸収は増加し、メルカプト酢酸添加時でみられた吸収スペクトルよりも長波長側 (570, 620, 689 nm) に吸収がみられるようになった。このように、カルボン酸とアルコール基をもつチオール化合物では異なる結果が得られた。これらの吸収変化はチオール化合物が活性中心部位に存在する Co(II) に配位したことを示す。

Bicknell 等は、アンジオテンシン II 変換酵素の Co(II) 置換酵素を調製し、チオール阻害剤であるカプトプリルの作用を分光学的に調べている。¹⁰⁾ この酵素の Co(II) 置換酵素は 525 nm ($\epsilon = \text{ca. } 75 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) に吸収を示した。この吸収の増大と波長の移動は、チオレートの Co(II) に配位による d-d 吸収帯の変化によるとされている。IMP-1 にチオール化合物を添加した時の変化の特徴は、350 nm のチオレートから Co(II) への電荷移動吸収帯の波長が変化せず吸収強度のみ増加したことと、500–720 nm の吸収の変化が吸収帯のシフトよりむしろ新たな吸収が付加されたようにみえることである。これらの試料には、酵素 1 mol に対し全体として Co(II) は 2 mol 含まれていることから、チオール化合物が酵素に結合していない遊離の Co(II) と錯形成する可能性が考えられたが、同一濃度の CoSO_4 の緩衝液へメルカプト酢酸を添加すると図 6 の結果となり、阻害剤を添加した時の吸収度の増加したスペクトルと全くことなることから、この可能性は否定される。

Anthony 等は CcrA メタロ- β -ラクタマーゼと阻害剤であるカプトプリルやチオマンデル酸との結合様式を polarizable molecular mechanics method SIBFA を用いて推定した。^{11, 12)} その結果、阻害剤-酵素複合体の安定な構造は、阻害剤のチオール基が活性中心の両方の金属イオンに結合し、阻害剤の他の置換基 (カルボキシル基やカルボニル基) は活性中心部位の周辺のアミノ酸残基と相互作用するような構造であると考えられた。

この結果は、BlaB メタロ- β -ラクタマーゼと D-カプトプリルとの複合体の X 線結晶構造解析の結果からも支持される。¹³⁾

以上、本研究で得られた Co(II) 置換 IMP-1 酵素とチオール化合物との分光測定の結果と動力学ならびに X 線結晶構造解析の結果を総合的に判断すると、メルカプト酢酸や 2-メルカプトエタノールのチオレート基は活性中心部位に存在する二つの金属イオンへ配位し (図 3)、これにより IMP-1 の酵素活性を阻害するもの

と考えられる。

D. 結論

本研究では、IMP-1 メタロ- β -ラクタマーゼのアポ酵素を調製し、複核金属活性中心部位における金属イオン選択性と IMP-1 阻害剤であるチオール化合物と Co(II) 置換 IMP-1 との相互作用を分光学的に検討した。

以下に、今回の研究成果を総括する。

(1) Co(II) と Zn(II) の二種類の金属イオンでアポ IMP-1 酵素を分光滴定した結果、両サイトで Zn(II) は Co(II) より親和性が高く、Zn(II) はサイト 2 よりサイト 1 との親和性が高かった。

(2) Co(II) 置換 IMP-1 酵素の活性部位の金属イオンに阻害剤のチオレート基が配位することを明らかにした。阻害剤であるチオール化合物は、Zn(II) を含むホロ酵素の場合にもサイト 1 とサイト 2 の両サイトへの配位によって酵素活性を阻害することが支持された。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

IMP-1 メタロ- β -ラクタマーゼとチオール化合物との相互作用、山口佳宏、荒川宜親、黒崎博雅、第 39 回薬剤耐性菌研究会、群馬県伊香保温泉平成、22 年 11 月。

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・実用新案登録

なし

G. 参考文献

1. Ambler R. P., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **289**, 321-331 (1980).
2. Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., Ito H., Wacharotayankun R., Ohsuka S., Kato N., Ohta M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1612-1615 (1995).
3. Cornaglia G., Riccio M. L., Mazzariol A., Lauretti L., Fontana R., Rossolini G. M., *Lancet*, **353**, 899-900 (1999).
4. Concha N. O., Janson C. A., Rowling P., Pearson S., Cheever C. A., Clarke B. P., Lewis C., Galleni M., Frère J.-M., Payne D. J., Bateson J. H., Abdel-Meguid S. S., *Biochemistry*, **39**, 4288-4298 (2000).
5. Goto M., Takahashi T., Yamashita F., Koreeda A., Mori H., Ohta M., Arakawa Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**,

- 1136-1140 (1997).
6. Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K., Kurokawa H., Yagi T., Fujiwara H., Goto M., *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 40-43 (2000).
 7. Riordan J. F., Vallee B. L., *Methods Enzymol.*, **158**, 3-6 (1988).
 8. Maret W., Vallee B. L., *Methods Enzymol.*, **226**, 52-71 (1993).
 9. Kuzmic P., *Anal. Biochem.*, **237**, 260-273 (1996).
 10. Bicknell R., Holmquist B., Lee F. S., Martin M. T., Riordan J. F., *Biochemistry*, **26**, 7291-7297 (1987).
 11. Antony J., Gresh N., Olsen L., Hemmingsen L., Schofield C. J., Bauer R., *J. Comput. Chem.*, **23**, 1281-1296 (2002).
 12. Antony J., Piquemal J. P., Gresh N., *J. Comput. Chem.*, **26**, 1131-1147 (2005).
 13. García-Sáez I., Hopkins J., Papamicael C., Franceschini N., Amicosante G., Rossolini G. M., Galleni M., Frère J.-M., Dideberg O., *J. Biol. Chem.*, **278**, 23868-23873 (2003).

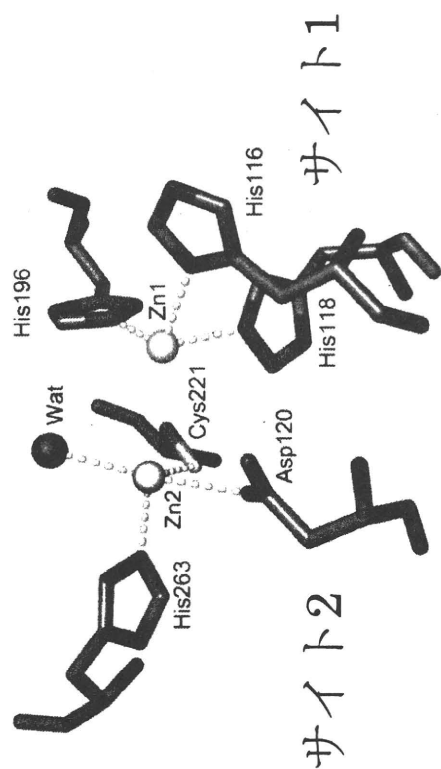


Fig. 1. Schematic Representation of the Active Site of IMP-1 from *Pseudomonas aeruginosa* (PDB code 1DDK). The Zn(II) atoms and a water molecule are shown as spheres.

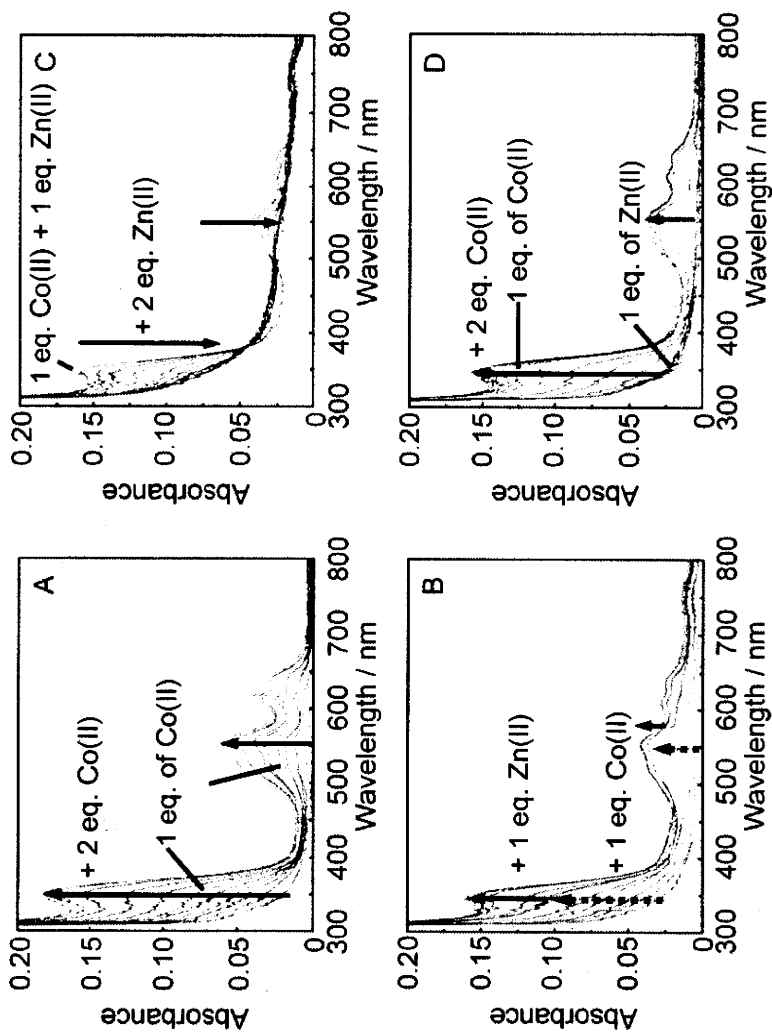


Fig. 2. UV-visible Spectral Changes of Apo-IMP-1 with Varying Concentrations of Co(II) or Zn(II). (A) Solid arrow: Apo-IMP-1 (150 μ M) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.0 M NaCl and 25% glycerol was titrated by 0.2 equiv of Co(II) to a total of 2 equiv. (B) 1 equiv of Co(II) in increments of 0.2 equiv was added to apo-IMP-1 (178 μ M) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.0 M NaCl, and 25% glycerol (dashed arrow), followed by the addition of Zn(II) (0.2 equiv increments) up to 1 equiv (solid arrow). (C) 2 equiv of Zn(II) in increments of 0.2 equiv was added to apo-IMP-1 containing 1 equiv of Co(II) and 1 equiv of Zn(II) (see final spectrum in Fig. 2B). (D) 1 equiv of Zn(II) in increments of 0.2 equiv was added to apo-IMP-1 (178 μ M) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.0 M NaCl, and 25% glycerol, followed by the addition of Co(II) (0.2 equiv increment) up to 2 equiv (solid arrow).

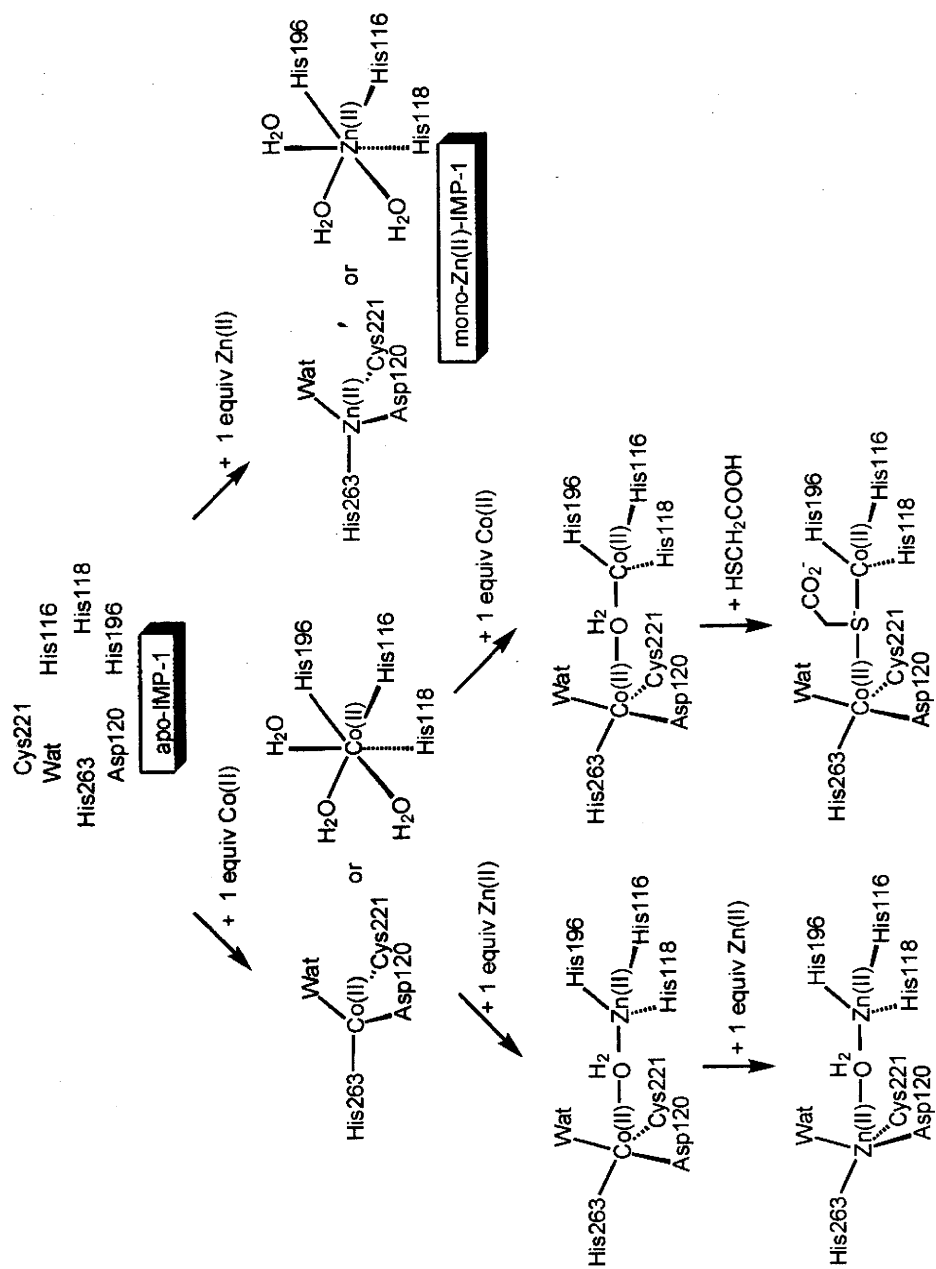


Fig. 3. Proposed Modes of Reconstruction of IMP-1 from Apo-IMP-1 by Zn(II) and Co(II) and the Interaction of Co(II)-substituted IMP-1 with Mercaptoacetic acid.

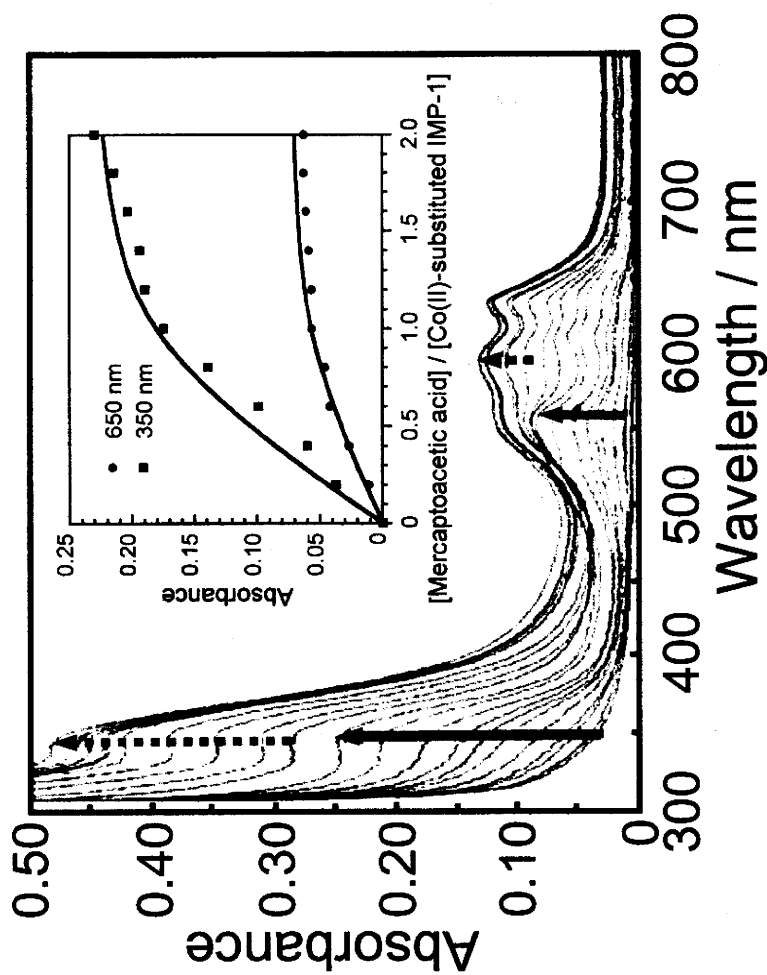


Fig. 4. Spectrophotometric Titration of Co(II)-substituted IMP-1 with Mercaptoacetic Acid. Solid arrow: Apo-IMP-1 (171 μ M) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.0 M NaCl, and 25% glycerol was titrated by 0.2 equiv of Co(II) to a total of 2 equiv. Dashed arrow: 2 equiv of mercaptoacetic acid in increments of 0.2 equiv was added to Co(II)-substituted IMP-1 [apo-IMP-1 containing 2 equiv of Co(II)]. Inset: Plot of the absorbances at 350 nm (squares) and 650 nm (circles) as a function of the concentration of added mercaptoacetic acid. The absorbances of apo-IMP-1 and Co(II)-substituted IMP-1 were subtracted from the absorbance of Co(II)-substituted IMP-1 added mercaptoacetic acid. The solid lines represent fits obtained from numerical simulation of a one-step binding model to the data using the program Dynafit (BioKin, Ltd.). The apparent dissociation constant obtained was 14 μ M.

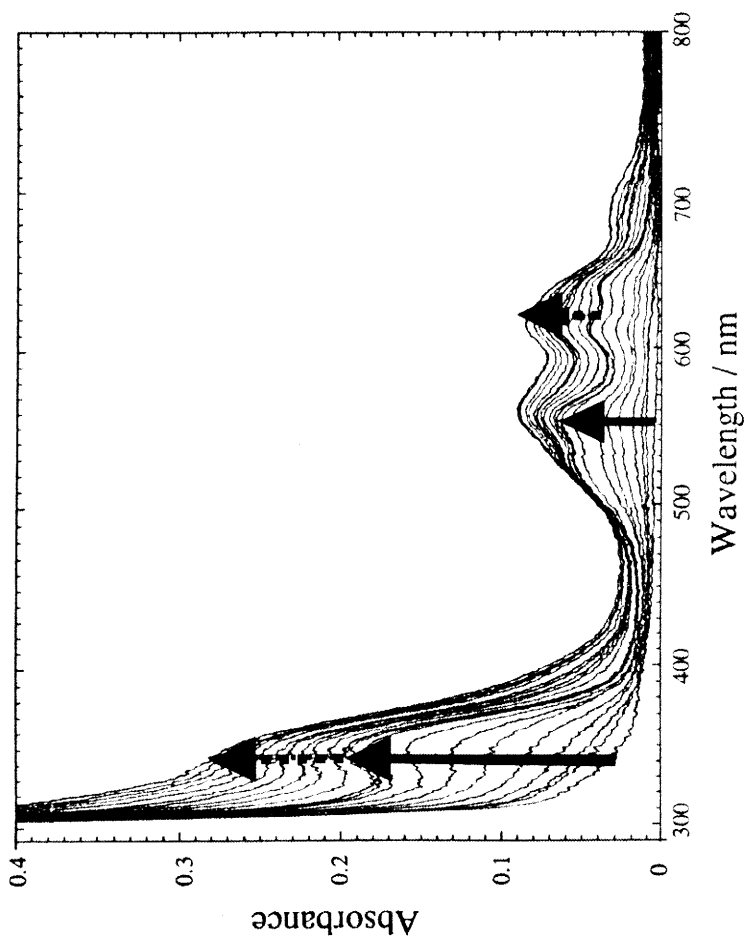


Fig. 5. Spectrophotometric Titration of Co(II)-substituted IMP-1 with 2-Mercaptoethanol. Solid arrow: Apo-IMP-1 (168 μ M) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.0 M NaCl, and 25% glycerol was titrated by 0.2 equiv of Co(II) to a total of 2 equiv. Dashed arrow: 2 equiv of 2-mercaptoethanol in increments of 0.2 equiv was added to Co(II)-substituted IMP-1 [apo-IMP-1 containing 2 equiv of Co(II)].

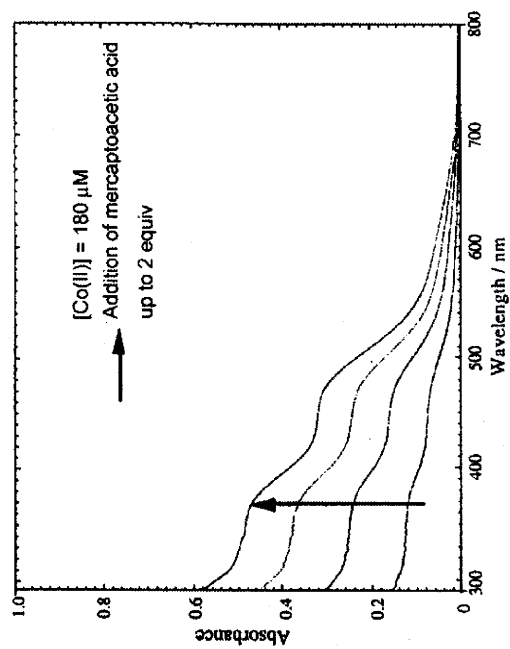


Fig. 6. UV-visible spectral changes of Co(II) with varying concentrations of mercaptoacetic acid.

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。昨年度の研究で、結核菌の酵素ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ Rv1330c がピラジナミドの活性型であるピラジン酸の存在下で ATPase 活性を発現することが明らかになった。今年度は実際にピラジナミドの作用で菌体内の ATP 濃度がどのような影響を受けるかを調べた。結核菌 H37Rv 株、BCG、及び結核菌のピラジナミダーゼを発現させた BCG を用いて、菌体をピラジナミドに暴露させた時の菌体内の ATP 濃度の変化を解析した。ピラジナミド感受性である結核菌 H37Rv 株と、ピラジナミダーゼを発現させた BCG は、400 μ g/ml のピラジナミドに暴露 6 時間後、菌体内の ATP 濃度に明らかな低下が認められた。一方、ピラジナミド耐性である BCG では、ATP 濃度の有意な変化は認められなかった。イソニアジドについてもそれぞれの菌株と同様に調べたところ、いずれも ATP 濃度に有意な変化は認められなかった。これらの結果から、ピラジナミドの作用メカニズムとして、菌体内でピラジナミダーゼによって活性型のピラジン酸に変換された後、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ Rv1330c に作用して ATPase 活性を発現させ、そして菌体内の ATP が分解されることが考えられた。現在、このニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ Rv1330c の結晶化、構造解析を進めている。今後この蛋白構造機能解析を進め、ドラッグターゲットと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）

酵素がピラジナミドの活性型であるピラジン酸の存在下で ATPase 活性を発現することを明らかにした。今年度は実際にピラジナミドの作用で菌体内の ATP 濃度が影響を受けるかどうかを調べた。

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が、昨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 Rv1330c に着目し、リコンビナント蛋白を作製して酵素学的な解析を進めた。そして、この

B. 研究方法

菌株は、結核菌は H37Rv 株、BCG は日本国内でワクチンとして使用されている Tokyo 株を用いた。

結核菌のピラジナミダーゼをコードする遺伝子 *pncA* を、抗酸菌用発現ベクター pVV16 にクローニングし、BCG を形質転換して結核菌のピラジナミダーゼを発現する株を作製した。また、BCG の *pncA* も同様にクローニングして BCG を形質転換し、BCG のピラジナミダーゼを発現する株も作製した。

結核菌と、BCG のそれぞれの株のピラジナミドに対する感受性の測定は、PZA 液体培地(極東製薬)を用いた。菌体のピラジナミドへの暴露は、PZA 液体培地(極東製薬)を用いた。

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の欠損株の作製は、欠損株作製用ベクター p2NIL と pGOAL19 を用いた。

結核菌及び BCG の菌体内の ATP の定量は、生菌数定量のために確立された方法(Vaccine. 2008 Aug 26;26(36):4754-7)を用いた。

倫理面への配慮
該当なし。

C. 研究結果

結核菌と BCG のピラジナミド感受性

結核菌 H37Rv 株のピラジナミドに対する MIC 値は 100 μ g/ml 以下だった。一方、BCG の MIC 値は 400 μ g/ml 以上だった。結核菌の *pncA* 遺伝子を発現させた BCG の MIC 値は、100 μ g/ml 以下になった。なお、BCG に BCG の *pncA* 遺伝子を発現させた株の MIC 値は、400 μ g/ml 以上のままだった。BCG の *pncA* 遺伝子がコードする蛋白のアミノ酸配列は結核菌 H37Rv のものと比較すると、57 番目のヒスチジンがアスパラギン酸に変わっている。これらのことから、BCG は *pncA* 遺伝子の mutation のためピラジナミダーゼ活性を失っており、ピラジナミドに対して耐性になっていることが分かった。

ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼとして機能している遺伝子

ゲノムデータベース上の annotation でニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼとされている遺伝子は、Rv0573c と Rv1330c の 2 つがある。Rv0573c については結核菌、BCG ともに欠損株が作成できた。しかし、この遺伝子の欠損によっても、ニコチンアミドの代謝に変化が認められなかった(図 1)。

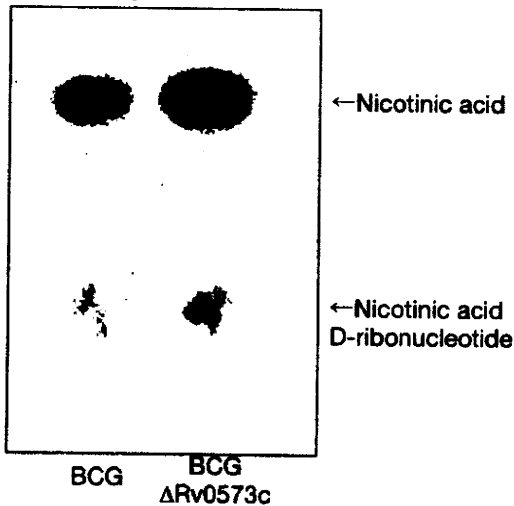


図 1. BCG、Rv0573c 欠損 BCG の Nicotinamide の代謝。PncA を発現させた BCG と Rv0573c 欠損 BCG に ¹⁴C-Nicotinamide を加え、30 分後に菌体から代謝産物を抽出し、TLC 展開した。

また、ピラジナミドの感受性についても、結核菌 H37Rv、Rv0573c 欠損 H37Rv 株、及び結核菌の *pncA* を発現させた BCG、結核菌の *pncA* を発現させた Rv0573c 欠損 BCG でいずれも MIC 値は 100 μ g/ml 以下で、明らかな変化は認められなかつ

た。BCG と、Rv0573c 欠損 BCG では MIC 値はいずれも 400 μ g/ml 以上だった。

これらのことから、Rv0573c は実際にニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼとして機能していないと考えられた。Rv1330c は、欠損株が作製出来なかったので、重要な遺伝子と考えられた。このため、Rv1330c に焦点をあてることとし、そしてこれまでのリコンビナント蛋白の解析で明らかになった ATPase 活性についてさらに解析を進めることとした。

ピラジナミドによる菌体内 ATP 量の変化

1) 結核菌 H37Rv

結核菌 H37Rv 株について、ピラジナミド暴露後の菌体内の ATP 量の変化を調べた(図 2)。その結果、暴露後 6 時間で菌の ATP 量が有意に減少することが明らかになった。なお、6 時間後の時点での生菌数を、ピラジナミドに暴露したものとしなかったものについて培養により測定したが、有意差が認められなかったので、ATP 量が減少したのは菌が死滅したものではないことが示された。

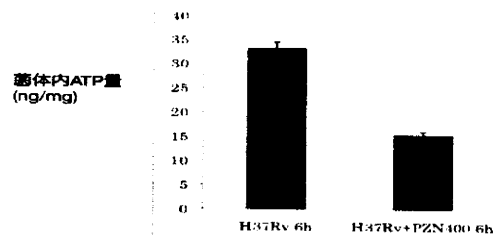


図 2. 結核菌 H37Rv をピラジナミドに暴露した時の菌体内 ATP 量の減少。ピラジナミドを暴露した菌は、培地だけの菌と比較して ATP 量が半分程度に減少した。

2) 結核菌の *pncA* 遺伝子を発現させた BCG

結核菌の *pncA* 遺伝子を発現させてピラジナミド感受性にさせた BCG についても同様の実験を行った(図 3)。結核菌同様、ATP 量が減少することが分かった。また、同様に 6 時間後も生菌数は減少していなかった。

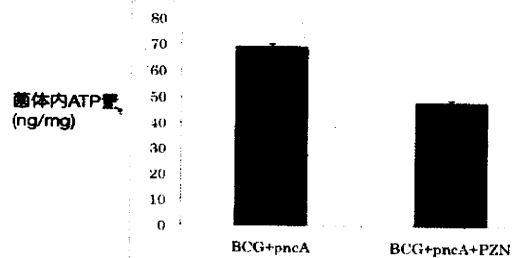


図 3. 結核菌の *pncA* 遺伝子を発現させた BCG をピラジナミドに暴露した時の菌体内 ATP 量の減少。ピラジナミドを暴露した菌は、培地だけの

菌と比較して ATP 量が有意に減少した。

3) BCG

さらに、ピラジナミド耐性の BCG についても同様の実験を行った(図 4)。これについては明らかな ATP 量の変化は認められなかった。つまり、ピラジナミドの暴露による ATP 量の減少は、ピラジナミド感性の菌にのみ起こることが分かった。

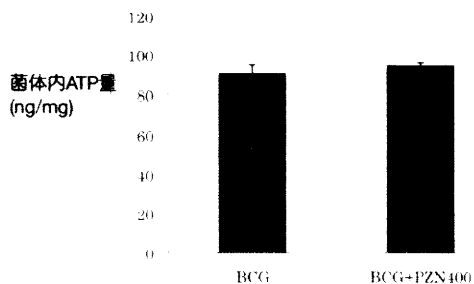


図 4. BCG をピラジナミドに暴露した時の菌体内 ATP 量。ピラジナミドを暴露した菌は、培地のみの菌と比較して ATP 量に明らかな差は認められなかった。

イソニアジドによる菌体内 ATP への影響

さらにこの ATP の減少が、ピラジナミド特異的な現象かどうかを確かめるため、イソニアジドを用いて同様の実験を行った(図 5)。BCG をイソニアジド 50 μ g/ml を含む 7H9 培地で 6 時間インキュベートして、同様に菌体内の ATP 量を定量した。イソニアジドによっては、菌体内の ATP 量に有意な変化は認められなかった。また、6 時間の時点で生菌数に有意な減少は認められなかった。このことから、ATP の減少はピラジナミドが菌体内でピラジニン酸に変換され、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼに作用して ATPase 活性を発現していることによるものであることが強く示唆された。

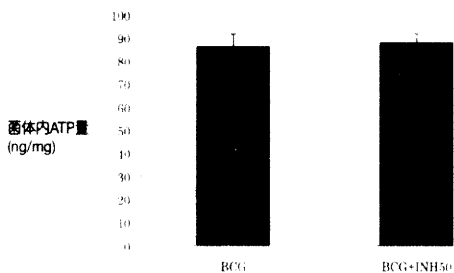


図 5. BCG をイソニアジドに暴露した時の菌体内 ATP 量。イソニアジドを暴露した菌は、培地のみの菌と比較して ATP 量に明らかな差は認められなかった。

D. 考察

これまでの結果から、ピラジナミドはその活性型であるピラジニン酸がニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(Rv1330c)に作用し、菌体内でニコチン酸の正常な代謝を阻害するとともに ATPase 活性を発現させて ATP を消耗させることが、その抗菌活性のメカニズムであ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(Rv1330c)は、ピラジナミドの標的分子である可能性が高い。この蛋白を結晶化し、そして構造解析を行うことで、新規薬剤の開発につながる事が出来ると期待される。

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

国内の皮膚感染症患者より分離された市中感染型 MRSA の解析

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)

研究要旨 市中感染型 MRSA (Community Associated MRSA:CA-MRSA) は院内感染型の MRSA と異なり、一般社会において広がっている耐性の黄色ブドウ球菌である。本菌は米国を中心に 2000 年以降、急激に拡大する傾向にあるが、国内ではその状況がまだ十分に把握されているとは言いがたい。そこで今回、CA-MRSA の感染症として認められやすい皮膚感染症を対象として、国内で分離された CA-MRSA を対象に検討を行った。2010 年 2 月から 2010 年 9 月までに日本各地の医療機関から検査センターに培養を目的として提出された皮膚疾患患者からの検体 5577 件を対象とした。そのうち、培養・同定結果をもとに MRSA の基準を満たす菌株が 241 株得られた。それらの株を対象に SCCmec typing を行った結果、type IV あるいは type V の CA-MRSA と判定された菌株は 141 株 (58.5%) 存在した。患者の年齢分布としては、10 歳未満の患者が最も多数を占め、10 歳代にも多くの患者を認めたが、30 代~50 代にも比較的多くの患者が存在し、60 代以上の高齢者でも比較的少数ながら患者が存在していた。さらに黄色ブドウ球菌の代表的な病原因子の有無を PCR にて検索した結果、PVL (Panton-valentine Leukocidin) は type IV 100 株中 22 株 (22%)、type V 41 株中 1 株 (2.4%) に確認された。さらに ET (exfoliative toxin) および TSST-1 (Toxic shock syndrome toxin 1) も比較的高い頻度で確認された。これらの結果から、国内においても、CA-MRSA は皮膚感染症の起炎菌として少なからず分離されており、MRSA の中では約 6 割を占めていることが明らかとなった。また、従来の疫学的調査では PVL 産生株はほとんど分離されないと報告されていたが、私達の検討結果では type IV の MRSA 株の約 2 割から PVL 遺伝子が検出されたことから、毒性の強い株が増加している傾向が示唆された。

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康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、臨床的に最も CA-MRSA 感染が多い皮膚感染症を対象とし、検査センターで分離された MRSA の菌株を用いて、全国レベルでの分離菌株の評価を実施する。菌株を用いて各種の解析を行った。

B. 研究方法

2010 年 2 月から 2010 年 9 月までに日本各地の医療機関から検査センターに培養を目的として提出

された皮膚疾患患者からの検体 5577 件を対象とした。

対象菌株は、1) 外来患者由来、2) 皮膚や膿から分離、3) 微量液体希釈法で MIPIC \geq 4 μ g/mL または ディスク法で CFX \leq 21mm、のすべての条件を満たす 241 株を対象とした。なお、同一患者からの検体は除外した。

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 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抗菌薬に対する感受性を測定した。また、黄色ブドウ球菌の代表的な病原因子である PVL (Panton-valentine Leukocidin)、ET (exfoliative toxin) および TSST-1 (Toxic shock syndrome toxin 1) の有無を PCR にて検索した。

(倫理面への配慮)

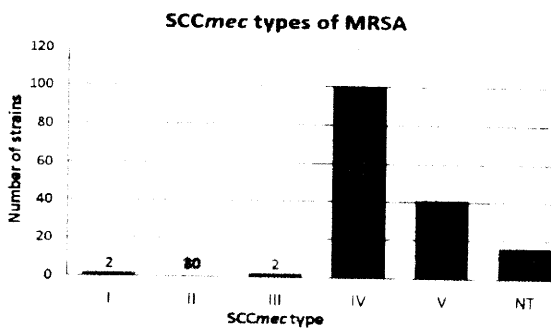
今回、対象症例の個人情報提供は受けておらず、菌株のみの検討を行った。

C. 研究結果

1) MRSA に占める市中感染型の頻度

MRSA 241 株のうち、SCCmec type-IVは 100 株、SCCmec type-Vは 41 株であった。これにより計 141 株が CA-MRSA と判定され、MRSA 全体の 58.5%を市中感染型が占めていることが明らかとなった(図1)。

図1. MRSA 臨床分離株の SCCmec 型別による分類

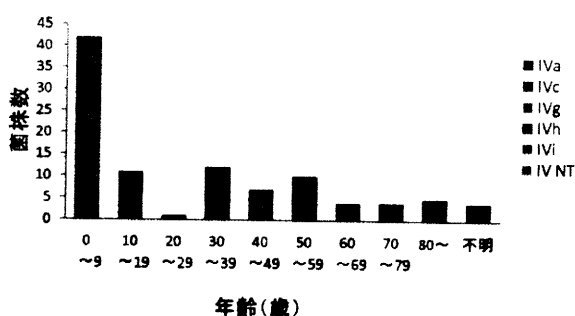


2) CA-MRSA 分離例の年齢分布

CA-MRSA が分離された患者の年齢分布としては、SCCmec type-IVの菌株の分離例を対象として集計を行うと、10 歳未満の患者が最も多数を占め、10 歳代にも多くの患者を認めたが、30 代~50 代にも比較的多くの患者が存在し、60 代以上の高齢者でも比較的少数ながら患者が存在していた (図2)。

さらに type-IVのサブタイプを検討したが、10 歳未満では non-typable (NT)に次いでIVaのタイプが最も多くを占めていた。その他の年齢でも NT のサブタイプは多く認められたが、IVc のタイプも比較的多く認められた。

図2. CA-MRSA 分離例の年齢別分類と SCCmec type-IVのサブタイプ



3) 病原因子の解析

CA-MRSA の重要な病原因子である PVL は type IV 100 株中 22 株 (22%), type V 41 株中 1 株 (2.4%) に確認された。さらに黄色ブドウ球菌全般的に検出頻度の高い ET は HA-MRSA に該当する type II の株でも 80 株中 23 株 (28.6%) と分離されていたが、typeIVの菌株では 15 株 (15.0%), typeV の菌株では eta が 22 株 (53.6%), etb が 14 株 (34.1%) と高率に検出された。

さらに TSST-1 も黄色ブドウ球菌として重要な病原因子であるが、type II の株でも 80 株中 32 株 (40.0%) 分離されたが、typeIVの菌株では 46 株 (46.0%) とさらに高率に検出された (表1)。

表1. 各種病原因子のタイプ別検出状況 (株数)

SCCmec 株数	I	II	III	IV	V	NT	Total
株数	2	80	2	100	41	16	241
PVL (lukpvSF)	-	-	-	22	1	2	25
ET(eta)	-	-	-	2	22	-	24
ET(etb)	-	23	-	13	14	7	57
ET(eta)	-	-	-	-	-	-	0
TSST-1	-	32	-	46	-	3	81

4) 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2に示した。

今回得られた CA-MRSA 臨床分離株の薬剤感受性成績を2つの SCCmec のタイプ別に集計し、その結果を表2に示した。全体として IPM に対して感受性を示す菌株の割合が多く、typeIVでは 95%、type II では 100%の株が感性であった。LVFX や CLDM, MINO に対しても感受性を示す菌の割合が高くおよそ 6~7 割程度が感性菌であった。一方、EM や GM には 3 割程度が感受性を示すのみで、アミノグリコシド系抗菌薬やマクロライド系抗菌薬には耐性菌の占める割合が高いことが明らかとなった。ST 合剤については 9 割以上が感受性を示した。

表 2. CA-MRSA 分離株の感性菌の割合 (%)

抗菌薬および感性の 基準 ($\mu\text{g/ml}$)	SCCmec type	
	IV	V
CEZ (≤ 8)	48	98
IPM (≤ 4)	95	100
GM (≤ 4)	32	5
LVFX (≤ 1)	66	85
CLDM (≤ 0.5)	62	71
EM (≤ 0.5)	31	22
MINO (≤ 4)	58	68
ST ($\leq 2/38$)	97	93

D. 考察

皮膚感染症が疑われて培養を目的として提出された 5577 検体から、MRSA が 241 株 (4.3%) 分離された。これはこれまでの国内の各種の検討結果と比較しても大差ない数字と考えられる。今回の対象患者は全て外来に限定したため、基本的には市中感染として発症した患者が多いと思われるが、その中でも 4%前後から MRSA が分離されたことは、すこしずつ市中にも MRSA が浸透してきている状況を反映しているものと思われる。

その MRSA の中で SCCmec typing によって CA-MRSA と判定された菌株は 141 株 (58.5%) に達していた。この点については、従来の私達の予想を超える結果であった。すなわち、国内においても CA-MRSA が HA-MRSA よりも多く市中に広がっていることを証明する結果となり、CA-MRSA が従来よりさらに浸透してきていることが示唆された。

CA-MRSA が分離された患者の年齢分布として、10 歳未満の患者が最も多数を占め、10 歳代にも多くの患者を認めた点は海外における状況とほぼ同等と考えられる。しかしこのような小児や青年だけでなく 30 代~50 代にも比較的多くの患者が存在していたことは特記すべきであり、さらに 60 代以上の高齢者からも少数ながら CA-MRSA の分離例が存在して

いたことは、必ずしも年齢に限定されずに CA-MRSA が分離される可能性が示唆される。

病原因子の検索については、CA-MRSA の代表的な病原因子とされる PVL が type IV の株中のおよそ 2 割から分離された。従来、PVL 産生株は国内からはほとんど分離されないという報告が続いていたため、この結果は私達の予想を遥かに上回るものであった。その理由として、一部で流行した菌株が今回の対象の中に多く含まれた可能性も考慮したが、CA-MRSA が分離された地域や施設に大きな偏りは認められなかった。まだ今回の結果だけで最終的な結論に至るのは早いと思われるが、それでも PVL 陽性株が増加する傾向が認められる点は今後、本菌による重症感染症のリスクが高まるという意味でも注意すべき点と思われる。さらに ET および TSST-1 も HA-MRSA に劣らず比較的高い頻度で確認されたため、CA-MRSA の病原因子として PVL 以外の毒素についても注意が必要と思われる。

薬剤感受性については、CA-MRSA は一般的に β -ラクタム系抗菌薬には耐性を有するといわれているが、カルバペネムについてはまだ多くの菌株が感受性を示すと考えられた。また、LVFX や CLDM、MINO に対してはおよそ 6~7 割程度が感受性を示したため、軽症例についてはこれらの抗菌薬を用いた治療も可能と考えられる。その一方で、EM や GM には 3 割程度が感受性を示すのみであったことから、アミノグリコシド系抗菌薬やマクロライド系抗菌薬を選択しても有効性は低いと考えられる。

今回得られた菌株は、全国の医療機関から集められた臨床検体から分離されたものであり、現在の国内の状況を反映していると思われる。その一方で、患者背景を含めた詳細な調査については患者情報の制約のため困難であった。今後、対象菌株を増やして検討を行うと共に、患者背景や臨床面での情報を含めて検討することが必要と考えられる。

E. 結論

全国の医療機関から培養を目的として提出された皮膚感染症患者の検体から約 4%の頻度で MRSA が分離され、そのうち約 6 割が市中感染型であった。年齢別には若年層以外の患者からも CA-MRSA が分離された。CA-MRSA と判定され

た菌株の2割から PVL が検出されたことは、従来の報告を遥かに上回る結果であった。薬剤感受性については、アミノグリコシド系やマクロライド系抗菌薬に対する耐性化が懸念される。これらの結果から、従来報告されていたのとは異なるいくつかの結果が示されており、今後、さらに国内における CA-MRSA の検討を継続し、その状況を把握していく必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 山口哲央, 松本哲哉. 市中感染型 MRSA. 臨床検査. 54: 497-503. 2010

2) 松本哲哉. 市中感染型 MRSA. 感染制御. 5: 535-537. 2010

2. 学会発表

1) Yamaguchi T, Nakamura I, Chiba K, Matsumoto T. Epidemiological Analysis of Community Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from University Hospital in Japan. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Boston. 2010. 9. 13.

2) Matsumoto T. Antimicrobial resistance surveillance in japan (Symposium). 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases. Singapore. 2010. 12. 5.

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

多剤耐性菌の耐性機序に関する研究

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、多剤耐性菌、特に抗酸菌の耐性機序を解明および治療法を開発する事を目的とし、抗酸菌の治療効果に関する研究を行い、同じ抗酸菌である *M. tuberculosis* と比較すると非結核性抗酸菌症、特に、*Mycobacterium Avium and Intracellulare Complex* (MAC)における薬剤感受性の設定は現実とかけ離れているという成果を得た。その結果、2007 American Thoracic Society (ATS) guidelineにおける薬剤感受性が不要につながっている。そしてMACのMICによる薬剤感受性試験の判定域の再評価が必要ということが明らかとする事ができ、肺非結核性抗酸症、特に *M. avium* 症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）
永井 崇之 （同上）
田村 嘉孝 （同上）

A. 研究目的

American Thoracic Society(ATS)ガイドライン(2007)によると、肺MAC症に対して *Mycobacterium avium*と *intracellulare*は、治療に影響がないので区別する必要がない。また、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。非結核性抗酸菌症 (NTM)、特に *Mycobacterium avium and intracellulare* (MAC)は、治療抵抗性である。MACの加療は、リファンピシン(RFP)、エタンブトール(EB)、クラリスロマイシン(CAM)が使われる。さらに、日本ではリファブチン(RFB)の使用が可能になった。MACの加療においては、CAMが主要な薬剤であり、その薬剤感受性が治療効果に大きく影響すると言われているが、RFP、RFBのMAC治療に対する薬剤感受性の効果は不明な点が多い。我々は、MAC治療におけるRFPの感受性試験は、以下の理由により測定する事に意義があるという仮説を立てて実験を行った。

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おり治療効果との乖離を生じる。
2. 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。

今回、MAC症に対する治療目的の為に使用されるRFPとRFBのMIC、*rpoβ*のhotspotの遺伝子変異を測定し、結核菌のそれと比較した。

B. 研究方法

Mycobacterium tuberculosis 90株、*Mycobacterium avium* 100株、*Mycobacterium intracellulare* 50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。また、これらMIC値を測定した株に対して *rpoβ*のhotspotのシーケンスを行いRFPのMIC値、RFBのMIC値および変異部位と変異様式間の比較を行った。

倫理面への配慮

今回の研究は個人情報扱わない。また、喀痰から抽出した抗酸菌なので倫理的に問題ないと判断した。

C. 研究結果

#1. Rifampicinとrifabutinに対する *M. tuberculosis*のMIC

Rifampicin: 最大構成数を有するMIC値は0.008であった。また、RifampicinのMICが0.03未満の結核菌株においては、*rpoβ*領域の遺伝子変異は認められなかった。また、遺伝子変異がある株において主要な、*rpoβ*領域の遺伝子変異は、S531L、H526Y、H526R、D516Vであった。
Rifabutin: 最大構成数を有するMIC値は0.002であった。

RifampicinにおいてMIC値>1の結核菌株がRFBにて、RFPよりもMIC値の低下が認められるがすべてMIC > 0.05であった。

*rpoβ*に他に遺伝子変異があっても、D516V遺伝子変異がある場合、Agar proportion methodにて薬剤感受性を求めた場合、RFPに対しては薬剤耐性株であるが、RBTに対しては感受性株であった。

#2. Rifampicinとrifabutinに対するMACのMIC

RFPにおいては、*Mycobacterium avium*は、MIC値1を最大数として分布し、一方、*Mycobacterium intracellulare*は、MIC値0.12を最大数として一峰性分布した。

RFBにおいては、*Mycobacterium avium*は、MIC値0.06を最大数として一峰性分布し、同様に、*Mycobacterium intracellulare*においても、MIC値0.06を最大数として一峰性分布した。*M. avium* ATCC 25291および*M. intracellulare* ATCC 13950の遺伝子配列を比較するとすべての菌株において*rpoβ* hotspotに変異が認められた。

MACのMIC分布は*M. tuberculosis*と比べ高く、しかも薬剤感受性域が高く設定されており*M. tuberculosis*で耐性と判断されるMIC値でもMACでは感受性と判断された。

D. 考察

今回の我々の研究結果より、*M. tuberculosis*に対してRFPのMICは、0.03よりもさらに低いMIC濃度を示す事がわかった。*M. tuberculosis*に対してRFPのMIC分布を考慮すると、RFPの感受性域は現在の0.06から、さらに低く設定されるべきかもしれない。*M. tuberculosis*に対してRFPのMICを最小0.0005 μg/mlまで測定するとさらに低いMIC濃度を示す事がわかった。これらのことよりRFPの感受性域はさらに低く設定されるべきかもしれない。同じ、*M. tuberculosis*においてRFBはRFPよりも低いMICを示す傾向にあり、現在の薬剤判定基準では、RからI, Sになる株もある。しかしながらほとんどが0.03より上であり臨床効果があるかは不明であり、今後のデータの蓄積が必要である。同じ抗酸菌である*M. tuberculosis*と比較するとNTM特に、MACにおける薬剤感受性の設定は現実とかけ離れている。このことが2007 ATS guidelineにおける薬剤感受性が不要につながっている。MACのMICによる薬剤感受性試験の判定域の再評価が必要と判断する。また、RFPに対してMICが0.03の株が

あることより、治療の際はMIC測定を行い、MICが高い場合はRFPをしようせず、MICが低い場合はRFPもしくはRFBを加療メニューに加えるのが望ましい。同じ、*M. tuberculosis*においてRFBはRFPよりも低いMICを示す傾向にあり、現在の薬剤判定基準では、RFPではRからRFBでは、I, Sになる株もある。しかしながらほとんどがRFBに対してMICが0.03より上であり臨床効果があるかは不明である。

今回の我々の検討では、D516Vに遺伝子変異がある場合、Agar proportion methodにて薬剤感受性を求めた場合、RFPに対しては薬剤耐性株であるが、RBTに対しては感受性株であった。したがってD516V変異があれば、RFP耐性結核菌株でRFBが感受性なので、RFBが使用できる可能性があるが、このような菌株に対してRFBを使用してもMICが高く臨床効果が期待できない可能性が高い。

MACに対してRFPの代わりにRFBを使用した場合、MICの低下が認められ、一部、MIC 0.03以下のMAC菌も認められる。このような菌に対してRFBを使用すると治療効果が得られる可能性が高いと思われる。

E. 結論

同じ抗酸菌である*M. tuberculosis*と比較するとNTM特に、MACにおける薬剤感受性の設定は現実とかけ離れている。このことが2007 ATS guidelineにおける薬剤感受性が不要につながっている。MACのMICによる薬剤感受性試験の判定域の再評価が必要と判断する。また、RFPに対してMICが0.03の株があることより、治療の際はMIC測定を行い、MICが高い場合はRFPを使用せず、MICが低い場合はRFPもしくはRFBを加療メニューに加えたほうが妥当である。今回の我々の検討ではRFP耐性の*M. tuberculosis*において、*rpoβ*にD516V遺伝子変異がある場合、他に遺伝子変異が存在してもAgar proportion methodでは、RFPに対しては薬剤耐性株であるが、RBTに対しては感受性株であることが明らかとなった。しかしながらこのような場合にRFBを使用しても、MIC値が高いので薬剤感受性試験では感受性と判定されても臨床効果が期待できない可能性が高いことがわかった。

また、MACに対してRFPの代わりにRFBを使用した場合、MICの低下が認められ、一部、MIC 0.03以下のMAC菌の存在が認められる。このような菌に対してRFBを使用するとより高い治療効果が得られる可能性が高いと思われる。

F. 健康危機情報