

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Abadia, E. Zhang, U. Dos Vultos, T. Ritacco, V. Kremer, K. Aktas, E. Matsumoto, T. Refregier, G. Van Soolingen, D. Gicquel, B. Sola, C. 2010, Resolving lineage assignation on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method., *Infect Genet Evol*, 1066-74

2. 学会発表

- 1) 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌のVNTR解析. 松本智成. 大都市結核対策研究会, 2010年3月 大阪
- 2) Focus on Now and Problems about MDR-/XDR-TB using Molecular Epidemiology of Tuberculosis. 松本智成. 第83回日本細菌学会総会ワークショップ W6 新興・再興感染症の疫学情報からみた課題と問題点 2010年3月 東京
- 3) 生物製剤使用の為の結核対策. 松本智成. リウマチ医の為の肺障害研究会 2010年3月 東京
- 4) Focus on Now and Problems about MDR-/XDR-TB using Molecular Epidemiology of Tuberculosis. 松本智成. 第83回日本細菌学会総会 2010年3月 東京
- 5) 「感染症とサイトカイン」. 松本智成. 第84回日本感染症学会総会学術講演会 2010年4月 京都
- 6) 自動細菌タイピング装置、DiversiLabによる結核菌株の解析. 松本智成. 第84回日本感染症学会総会学術講演会 2010年4月 京都
- 7) 結核合併関節リウマチ患者8名に対する抗TNF製剤投与の安全性と有効性. 松本智成. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 兵庫
- 8) Safety of Anti-TNF Therapy for Rheumatoid Arthritis in Eight Patients with Tuberculosis. 松本智成. 第50回日本呼吸器学会総会 2010年4月 京都
- 9) トルコの結核菌株および大阪結核菌株間のDNA代謝遺伝子相同

性の新規SNPsでの解析-3-

VNTR 解析によるT3-Osaka株と2007年に大阪と東京で得られた結核菌株間の比較 財団法人大阪結核研究

会奨学研究費対象研究. 松本智成. 大阪結核研究会 2010年5月 大阪

- 10) 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌のVNTR解析. 松本智成, 阿野裕美, 鈴木克洋, 露口一成, 喜多洋子, 金丸典子, 坂谷光則, 西村一孝, 田尾義昭, 村上一生, 豊田恵美子, 中島由槻, 四元秀毅. 第80回実験結核研究会 2010年5月 京都
- 11) 細菌学4 (結核菌・抗酸菌・真菌等). 松本智成. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
- 12) 当センターで得られた *Mycobacterium tuberculosis* 株におけるrifampinとrifabutinのminimum inhibitory concentrationの検討. 松本智成, 阿野裕美, 田村嘉孝, 永井崇之. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
- 13) 当センターで得られた *Mycobacterium avium* 株および *Mycobacterium intracellulare* 株におけるrifampinとrifabutinのminimum inhibitory concentrationの検討: 結核菌株と比較してアビウムの加療時のrifampinのMICによる感受性試験結果は現実とあっていない可能性が高い. 松本智成, 阿野裕美, 田村嘉孝, 永井崇之. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
- 14) 結核合併関節リウマチ患者8名に対する抗TNF製剤投与. 松本智成, 阿野裕美, 田村嘉孝, 永井崇之. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都
- 15) 国立病院機構呼吸器ネットワークを利用し入手した薬剤感受性結核菌のVNTR解析. 松本智成, 阿野裕美, 鈴木克洋, 露口一成, 喜多洋子, 金丸典子, 坂谷光

則, 西村一孝, 田尾義昭, 村上一生, 豊田恵美子, 中島由槻, 四元秀毅. 第85回日本結核病学会 2010年5月 京都

- 16) 生物学的製剤使用時における結核のスクリーニング、予防内服、治療について. 松本智成. 日本内科学会東北地方会 第56回生涯教育後援会2010年6月 仙台

- 17) Anti-TNF Therapy for Rheumatoid Arthritis in Patients with Tuberculosis. Tomoshige Matsumoto. 45nd US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy 13

july, 2010, Broad Institute, Boston, MA

- 18) 多剤耐性結核の分子疫学解析とゲノム解析の今後展望. 松本智成. 第63回日本細菌学会九州支部総会 2010年9月 宮崎

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当無し |
| 2. 実用新案登録 | 該当無し |
| 3. その他 | 該当無し |

カルバペネム薬分解酵素の検出法構築に関する研究

研究分担者 山口 恵三 （東邦大学医学部微生物・感染症学講座）

研究要旨

本研究では、カルバペネム薬分解酵素の簡便な検出法の構築を目的として、新規メタロβラクタマーゼである NDM-1 の検出法とアシネトバクター属菌のカルバペネム薬耐性因子である OXA-型カルバペネマーゼの検出法に関する研究を行った。その結果、NDM-1 産生株の検出にはジピコリン酸が有用であることを明らかとする事ができた。これらの方法は、試薬が安価であること、作成した培地中のジピコリン酸は安定で長期間の保存に耐えること、さらに簡便な方法であることから臨床検査の現場において利用可能であり、院内感染の制御に貢献する事が期待される。

研究協力者

石井 良和 （東邦大学・微生物・感染症学講座）

舘田 一博 （同上）

A. 研究目的

カルバペネム薬はグラム陽性菌からグラム陰性菌までの幅広い抗菌スペクトルを有している。また、各種βラクタマーゼに対する安定性も比較的高いことから、耐性菌に対する治療薬として汎用されている。しかし、カルバペネム薬はメタロβラクタマーゼや一部の OXA-型カルバペネマーゼなどによって分解されることが知られている。それらの耐性因子を検出することは多剤耐性菌が院内で拡散するのを制御するために極めて重要である。

NDM-1 は 2009 年に初めて報告された新規メタロβラクタマーゼである。本邦でもこれまでに 3 例の感染例が報告されている。その内の 2 例は市中で本酵素産生菌を獲得した可能性が指摘されており、今後の拡散が危惧されている。

IMP-型や VIM-型のメタロβラクタマーゼの検出には、通常 SMA ディスク（栄研化学）が効果的であるが、NDM-1 産生菌に対しては効果的ではない。諸外国では、EDTA のキレート作用を応用した Etest（シスメックス）が汎用されている。しかし、メタロβラクタマーゼ検出用 Etest は、イミペネムおよびイミペネム-EDTA のコンビネーションストリップのみが販売されており、イミペネムに対する分解効率の低いメタロβラクタマーゼ産生株では偽陰性となることがある。したがって、イミペネムおよびセフトラジジムを用いた簡便で病院の検査室ですぐに実施可能な方法の構築が求められる。そこで今回は、Etest や EDTA やジピコリン酸を用いた方法について検討を加え

た。

B. 研究方法

最終濃度 300 μg/mL のジピコリン酸（シグマ）含有 Mueller-Hinton agar（日本ベクトン）とジピコリン酸不含 Mueller-Hinton agar を作成した。なお、ジピコリン酸は、Mueller-Hinton agar に添加した後、高圧蒸気滅菌を行った。供試菌液は生理食塩液を用いてマクファーランド No. 0.5 になるように調整し、定法に従って薬剤含有 Mueller-Hinton agar および薬剤不含 Mueller-Hinton agar 上に其々塗布した。そこに、イミペネムおよびセフトラジジムの KB ディスク（栄研化学）を貼布し、35℃で 16 時間培養し、阻止円径を計測した。また、MBL 検出用 Etest（シスメックス）は、上述の要領で菌液を塗布した Mueller-Hinton agar にストリップを貼布して 35℃で 16 時間培養し、添付文書に記載されている通りの方法で判定した。EDTA による検出は、SMA ディスクによる検出法と同様に菌液調整および KB ディスクの貼布を行った。SMA ディスクの代わりに薬剤感受性試験用の空ディスクを貼布し、そのディスクに 10 μL、20 μL あるいは 30 μL の 0.5M EDTA 溶液を滴下した。判定は他の試験と同様に 35℃で 16 時間培養後に行った。

B. 研究結果

NDM-1 産生大腸菌は、SMA-ディスクを用いて検出を試みたが、複数の菌株において偽陰性が認められた（下写真）。



NDM-1 産生肺炎桿菌
SMA ディスク側のイ
ミペネムの阻止円の拡
張を認めず、陰性と判
定される

一方、同菌株に対してメタロβラクタマーゼ検出用 Etest を用いて検出したところ、全ての菌株において正しく検出された（下写真）。



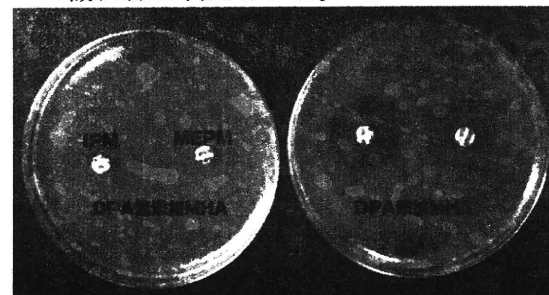
NDM-1 産生肺炎桿菌
Etest では阻止円の拡
張を認め、陽性と判定
される

30μL の EDTA 溶液を滴下したところ、EDTA 滴下ディスク周囲に著しい菌の発育阻害が認められた。一方、10μL の EDTA 溶液滴下ディスクにおいて、偽陰性となる菌株が散見された。下写真には 20μL の 0.5M EDTA 溶液を滴下した例を示した。左側のディスクに EDTA 溶液を滴下しているが、イミペネムディスクの左側（EDTA 滴下ディスク側）に阻止円の拡張を認め NDM-1 産生株がメタロβラクタマーゼ産生株であると正しく判定された。しかし、EDTA ディスク周囲では菌の増殖抑制が認められていた。



NDM-1 産生肺炎桿菌
EDTA ディスク側のイ
ミペネムの阻止円の拡
張を認めず、陽性と判
定される

300μg/mL のジピコリン酸含有培地上には、ジピコリン酸不含培地と同様の菌の発育を認めた。イミペネムおよびメロペネムの KB ディスク貼布例を下の写真に示した。ジピコリン酸無添加培地（左側）に認められなかった阻止円がジピコリン酸添加培地（右側）において明らかに認められている。このことから本菌株はメタロβラクタマーゼ陽性株と判定される。



下の表に他の NDM-1 産生株においても同様の結果が得られた（表 1）。

D. 考察

SMA ディスクによるメタロβラクタマーゼの検出法は、本邦の細菌検査の現場で広く利用されている特殊な器具や装置を必要としない優れた方法である。しかし、SMA ディスクを用いたメタロβラクタマーゼの検出法の原法は NDM-1 産生菌の検出には適さないことが今回の検討から判明した。SMA ディスクを用いた方法でも NDM-1 産生株をメタロβラクタマーゼ産生株であることが疑われる結果を得る場合もあるが、全 NDM-1 産生株においてこのような現象が観察されるわけではない。無論、SMA ディスクを用いた方法の変法による解決法もあるが、複数のメタロβラクタマーゼの検出方法を提供することも有用であると考え、今回の検討を実施した。

MBL 検出用 Etest が、諸外国で広く使われているメタロβラクタマーゼの検出方法である。MBL 検出用 Etest に利用されている抗菌薬はイミペネムのみである。しかし、メタロβラクタマーゼの中にはイミペネムの分解効率の悪い酵素の存在が既に知られている。したがって、低頻度ではあるが MBL 検出用 Etest のみでメタロβラクタマーゼ産生菌を鑑別しようとする偽陰性となる菌株がある。

MBL 検出用 Etest にはキレート剤として EDTA が利用されている。そこで、初めに空ディスクに EDTA 溶液を滴下する方法について検討した。0.5M EDTA を 20μL 滴下したところ、イミペネムディスク周囲に明瞭な阻止円の拡張が認められた。さらに、今回は示していないがセフトラジウムディスクの周囲にも同様な阻止円の拡張を認めた。しかし、EDTA は菌の発育阻害作用も強く、写真に見られるように EDTA 滴下ディスク周囲に菌の発育抑制帯が認められた。菌株によってはこの発育抑制作用がさらに強く認められる菌株もあり、EDTA はディスク法によるメタロβラクタマーゼの検出には適さないと考えられた。

次に当教室が予てよりメタロβラクタマーゼの検出に用いているジピコリン酸による検出法について検討した。これまでの私どもの検討から、ジピコリン酸は 400μg/mL までの濃度であれば菌の発育阻害作用を示さないことが明らかとなっていた。残念ながらジピコリン酸の拡散性が極めて悪いことから、SMA や EDTA のようにディスクから滲出させる方法をとることはできない。したがって、予めジピコリン酸含有培地を作成して使用することにした。その結果、NDM-1 産生株を感度よく検出することが可能となった。また、ジピコリン酸は安定性が高く、ジピコリン酸を添加

した培地を高圧蒸気滅菌することが可能である。さらに、ジピコリン酸を微量液体希釈法に応用したところ、同様の成績を得ている。すなわち、NDM-1 産生菌においてジピコリン酸添加時のイミペネムおよびセフトラジムに対する MIC 値が3管以上、抗菌薬単独の場合と比較して、改善を認めた。したがって、ジピコリン酸は NDM-1 を含むメタロβラクタマーゼの検出に有用であることが確認された。

E. 結論

ジピコリン酸を利用した NDM-1 を含むメタロβラクタマーゼの検出法を検討した。300 μg/mL のジピコリン酸を含む培地を用いると効率よく NDM-1 産生菌を検出することが可能であった。ジピコリン酸は NDM-1 産生菌の検出に有用である

と考えられた。

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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

本研究ではありません

2. 実用新案登録

3. その他

表1 ジピコリン酸添加培地と非添加培地における NDM-1 産生株のイミペネムおよびメロペネムによる阻止円形の差異

菌 株	阻止円径 (mm)			
	ジピコリン酸無添加		ジピコリン酸添加	
	イミペネム	メロペネム	イミペネム	メロペネム
<i>E. coli</i> 10014 (Japan)	15	12	27	28
<i>K. pneumoniae</i> 9926 (Sweden)	0	0	23	18
<i>K. pneumoniae</i> 10700 (UK)	0	0	25	19
<i>E. coli</i> 10701 (UK)	0	0	24	19

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、2009~2010年に全国の医療機関で分離された500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、マクロライド耐性化が急速に進行し、テリスロマイシン耐性もわずかながら出現していることを明らかにした。テリスロマイシン耐性菌の耐性機構に関する分子遺伝学的解析を行い、耐性化の主要因は高発現 *ermB* 遺伝子の獲得であることを明らかにした。さらに高発現 *erm* 遺伝子に、リボソーム蛋白 L22 の特定部位の変異が加わることによりテリスロマイシンに高度耐性化することを明らかにすることができ、肺炎球菌ケトライド高度耐性菌出現の予知情報提供に貢献すると期待できた。

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）

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。

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。

B. 研究方法

- 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% CO₂存在下で培養した。
- 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. 研究結果

(1) 2009年~2010年に全国の医療機関で分離された500株の肺炎球菌からTEL耐性菌1株(MIC=4μg/ml)、中等度耐性菌2株(MIC=2 μg/ml)、低感受性株17株(MIC=1 μg/ml)が検出された。先行の2005~2008年分離菌339株の調査では、低感受性菌が11株検出されたものの耐性菌は分離されなかった。今年度の研究成果は、国内で肺炎球菌のTEL耐性化が少ないながら進行していることを示唆している。

(2) TEL耐性菌S1215 (MIC=4μg/ml)の耐性因子を検討した結果、*ermB*を保有し、さらに23S rRNA

Antimicrobial	MIC (μg/ml)		
	range	50	90
telithromycin	<0.125 - 4	<0.125	0.5
erythromycin	<0.125 - >128	32	>128
clarithromycin	<0.125 - >128	8	>128
azithromycin	<0.125 - >128	>128	>128
spiramycin	<0.125 - >128	128	>128
tylosin	<0.125 - >128	>128	>128
rokitamycin	<0.125 - >128	0.5	32

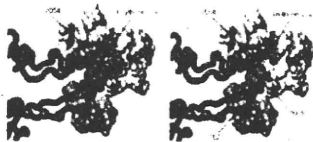
上に T150C の変異さらに riboprotein L4 に S20N の変異が明らかになった。*ermB* の欠損株 MIC は、感受性株と同レベルまで低下したことから、S1215 の TEL 耐性の主要因は、*ermB* がコードする methylase による rRNA のメチル化であると考えられた。*ermB* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、構造遺伝子とリーダーペプチド遺伝子の間に 28bp の欠失が明らかとなった。この欠失が *ermB* methylase 高発現を引き起こし、TEL 耐性をもたらした可能性を考えることができる。

(3) TEL 耐性の原因となる *ermB* の伝播機構を

Strain	MIC (TEL)	<i>ermB</i>	<i>mef</i> A/E	23SrRNA			riboprotein	
				Domain I	Domain II	Domain V	L4	L22
S1215	4	+	-	T150C	wt	wt	S20N	wt
S1	4	+	-	A138G T389T	C724T	wt	S20N	wt

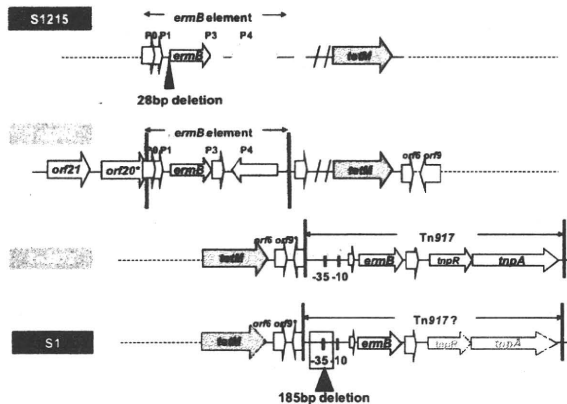
✓S1215: serotype 15C
a 84-year-old woman sputum
Ibaraki, Nov. 2009

✓S1: serotype 6B
a 61-year-old woman sputum
Nagasaki, Dec. 2001,



明らかにするために、S1215 並びに 2001 年に分離された TEL 耐性菌 P3084055 (S1) の *ermB* 周辺領域の構造解析を行った。*ermB* はテトラサイクリン耐性遺伝子(*tetM*)を含むトランスポゾンに組み込まれて複合型のトランスポソンを構築して伝播する例が多く報告されていることから、これらの既知のトランスポゾン構造との比較を行った。その結果、S1 は Tn3872 様の構造に大きな欠失を伴って構築されたこと、さらに S1215 には Tn6002 様の *ermB* element を有すると推測された。

(4) 肺炎球菌 TEL 高度耐性化機構の予測デー



タを得るために、S1 (MIC=4μg/ml) から実験室にて高度耐性菌 SP52 (MIC_{TEL}=128μg/ml) を選択した。Sp52 が保有する *ermB* をノックアウトした結果、MIC_{TEL} は <0.125μg/ml に低下したことから、*ermB* が TEL 高度耐性化に関わる重要な因子であると考えられた。この *ermB* を S1、標準株 TIGR4、Sp184 (Sp52*ermB* ノックアウト株) に導入すると、それぞれ MIC_{TEL} は 4μg/ml, 1μg/ml, 128μg/ml であったことから、Sp52 の TEL 高度耐性化には *ermB* に加え他の変異遺伝子が関与すると推察された。Sp52 では riboprotein L22 上に K94E の変異が生じていた。*ermB* と K94E の変異の相乗効果により TEL に高度耐性化する可能性が強く示唆された。

strain	origin	<i>erm</i> gene	mutation in L22	mutation in L4	MIC (μg/ml)	
					TEL	ERY
S1	clinical	<i>erm(B)</i>	wt	S20N	4	>128
Sp182	S1	? <i>erm(B)</i> :Sp	wt	S20N	<0.125	<0.125
Sp52	S1	<i>erm(B)</i>	K94E	S20N	>128	>128
Sp184	Sp52	? <i>erm(B)</i> :Sp	K94E	S20N	<0.125	<0.125
Sp184 <i>erm(B)</i> complement	Sp184	<i>erm(B)</i>	K94E	S20N	>128	>128

D. 考察

本年度の研究により分離された肺炎球菌 S1215 の TEL 耐性の主要因は外来性耐性遺伝子 *ermB* であると考えられた。*ermB* の獲得に加え、riboprotein L22 上の K94E 変異が生じると TEL 高度耐性菌が出現することが明らかとなった。L22 の 94 位のアミノ酸残基は、*ermB* methylase による 23SrRNA の修飾部位 2058 位に最も近接することから、これらの事実に基づき TEL 高度耐性化の詳細な機構の検討を来年度実施する。

E. 結論

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。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。しかし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て確実に増加していることさらに耐性菌が出現することが明らかとなった。さらに外来遺伝子 *ermB* の獲得にリボソーム蛋白

の変異が加わることにより容易に TEL 高度耐性化することが明らかとなったことから、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. 307:87-93 (2010)

2. 学会発表

A. Takaya and T.Yamamoto.

Molecular analysis of reduced telithromycin susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* collected clinically between 2005 and 2009 in Japan. International Conference on Antimicrobial Research. Valliadolid, Spain , Nov. 3-5 (2010)

G. 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

小児侵襲性感染由来β-ラクタム剤低感受性・耐性肺炎球菌の解析

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

2007年7月から2011年1月までに8県で分離された小児侵襲性感染症由来肺炎球菌441株の薬剤感受性を測定したところ、血清型19AでシークエンスタイプST320を示す菌は、6株全てがペニシリンGのMICとして2-4 µg/mL、メロペネムのMICとして0.25-0.5 µg/mLを示した。これらの株ではペニシリン結合たん白に変異が見られた。今後、小児用7価コンジュゲートワクチン接種率拡大にともない、このような薬剤耐性菌の分離頻度の上昇が懸念される。臨床現場への迅速な疫学情報の提供が重要である。

A. 研究目的

本邦でも、2010年2月より小児用7価コンジュゲートワクチン(PCV7)が接種可能になった。発売後11ヶ月の間に小児侵襲性感染症から分離された肺炎球菌のPCV7によるカバー率は77.9%と、PCV7発売前のカバー率76.7%と比べ、変化が見られなかった（厚生労働省神谷班2010年度報告書）。2011年に予定されている接種費用補助開始にともない、今後、接種率は上昇すると期待されている。一方、わが国においても、米国で見られているようなPCV7に含まれていない血清型による侵襲性感染の増加が起こるのではないかという懸念がもたれている。昨年度の分担研究では、PCV7に含まれる肺炎球菌の血清型のうち、

6B, 14, 19F, 23F肺炎球菌のβ-ラクタム剤耐性機序の解析を行い、同一の血清型/同一のシークエンスタイプ(ST)の中でもペニシリン結合たん白質(PBP)には異なる変異があり、それがβ-ラクタム剤耐性と関連していることを報告した。本年度の研究では、PCV7に含まれていない型である血清型19A肺炎球菌を対象とし、薬剤耐性とSTの解析をおこなった。

B. 研究方法

2007年7月から2011年1月までに8県で分離された小児侵襲性感染症由来肺炎球菌441株のうち、血清型19A肺炎球菌33株を対象とした。薬剤感受性は、CSLI M100-S18に従い微量液体希釈法にて測定した。マルチロー

カスシークエンスタイピング (MSLT) では、分離株の7つのアリル(*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*)の配列を決定し、<http://spneumoniae.mlst.net>にて検索を行った。また、 β -ラクタム剤感受性/耐性菌の PBP1a, PBP2x, PBP2b 遺伝子の解析を行い、 β -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 19A、33 株の ST は、ST667, 1 株 (3.0%); ST2331, 5 株 (15.2%); ST3111 21 株 (63.6%); ST320, 6 株 (18.2%)であった。ペニシリン G (PCG)、セフトキシム (CTX)、メロペネム (MEPM)、パニペネム (PAPM)の MIC 分布と ST の関係を図 1 に示す。ST2331 と ST667 はすべての薬剤に感受性を示したが、ST320 の 6 株はペニシリン G の MIC が 2-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、メロペネムの MIC が 0.25-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と耐性ないし非感受性を示した。これらの菌に対するパニペネムの MIC はメロペネムの MIC に比べ、2 管程度低い値を示した。一方、ST320 の菌のバンコマイシンの MIC は 0.25-0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と他の ST の菌同様、感受性域の値であった。

血清型 19A (ST320) の PBP1a, PBP2x, PBP2a のペニシリン結合部位周辺の配列を、血清型 19F (ST236,

1 株; ST1464, 2 株)および他の血清型の菌と比較した(表 1)。血清型 19F/19A の菌はいずれもペニシリン G の MIC が 2-4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、ペニシリン結合部位周辺のアミノ酸配列に同じ変異を持っていた。

D. 考察

ST320 の7つのアリル(*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*)番号は、4, 16, 19, 15, 6, 20, 1 である。ST1464 のアリル番号は ST320 とは *ddl* のみが異なり *ddl* 106 となる。*ddl* 1 と *ddl* 106 は 10 bp 以上の塩基配列が異なり、点突然変異で *ddl* 1 から *ddl* 106 が生じたのではないと考えられる。また、ST236 の7つのアリル番号は、15, 16, 19, 15, 6, 20, 26 であり、ST320 とは *aroE* と *ddl* の番号が異なる。これらのことより、ST320, ST1464, ST236 は、1 アリルなし 2 アリルが異なる近縁な ST ではあるものの、相互変換は容易には起こらないだろうと予想できる。PCV7 導入により海外で分離率が上昇している 19A の中には、19F で見られる ST と同じ ST を持つものがある。これらの菌においては、19F ポリサッカライド合成酵素遺伝子が 19A タイプのポリサッカライド合成酵素遺伝子に置き換わった(capsular switch)と考えられている(BMC Genomics 10:642-, 2009)。わが国において PCV7 導入前および導入後 11 ヶ月間に小児侵襲性感染から分離された血清型 19F 肺炎球菌 43 株中、ST236 は 37 株(86%)を占め、血清型

19F で ST320 の株は分離されていない。また、血清型 19A、33 株中 ST236 の分離は見られていない。このデータを見る限りでは、2011 年 1 月のわが国においては、血清型 19F と 19A 間の capsular switch は起こっていないと考えられる。今後、わが国において懸念される血清型 19A 肺炎球菌の分離増加が、19F ないし他の血清型からの capsular switch によるものであるか、もしくは、現在 19A から分離されている ST を持つ菌の伝播であるかを明らかにするために、継続した疫学研究が必要である。特に β -ラクタム剤耐性 / 低感受性である血清型 19A (ST320) が髄膜炎の起炎菌となった場合、問題は深刻であり、今後の疫学と薬剤耐性情報の臨床現場への迅速な情報提供が重要であると考えられる。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

E. 結論

PCV7 導入後に懸念される非ワクチンタイプの血清型の中で、薬剤耐性肺炎球菌に注目した観察研究と臨床現場への迅速な情報提供が重要である。

F. 健康危機情報
なし

G. 研究発表

1. B. Chang et al., Isolation of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 6D from the nasopharyngeal mucosa of healthy Japanese children. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63:381-383, 2010.

図1 血清型19A分離菌のβ-lactam剤に対する感受性 (n=33)

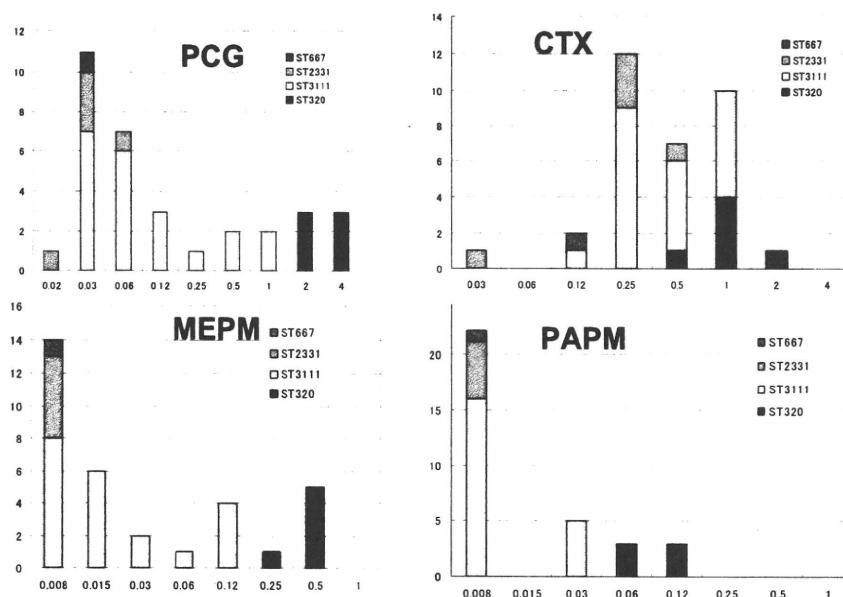


表1 ペニシリンG, セフトキシムのMICとPBP変異の関係

	PCG	CTX	<i>pbp1a</i>		<i>pbp2x</i>	<i>pbp2b</i>	
22F	≤0.015	≤0.03	STMK	SRNVP	STMK	YTQA	SSNT
4	≤0.015	≤0.03	STMK	SRNVP	STMK	YTQA	SSNT
9V	0.12	0.06	STMK	SRNVP	STMK	YTQA	SSNT
3	≤0.015	0.12	STMK	SRNVP		YTQA	SSNT
22F	0.06	0.25	STMK	SRNVP	STMK	YTQA	SSNT
19F(ST236)	2	1	SSMK	SRNVT	SAMK	YKLA	SSNA
19F(ST1464)	2	2	SSMK	SRNVT	SAMK	YKLA	SSNA
19F(ST1464)	4	2	SSMK	SRNVT	SAMK	YKLA	SSNA
19A(ST320)	4	1	SSMK	SRNVT	SAMK	YKLA	SSNA

PCG, ペニシリンG; CTX, セフトキシム

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
Wachino J, Shibayama K, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Arakawa Y.	RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms.	FEMS Microbiol Lett.	311	56-60	2010
Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y.	Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of <i>Acinetobacter</i> species.	J Antimicrob Chemother	65	1975-1983	2010
Wachino J, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y.	Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing <i>Escherichia coli</i> clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes.	Antimicrob Agents Chemother.	54	3061-3064	2010
Yamaguchi Y, Takashio N, Wachino J, Yamagata Y, Arakawa Y, Matsuda K, Kurosaki H	Structure of Metallo- β -lactamase IND-7 from a <i>Chryseobacterium indologenes</i> Clinical Isolate at 1.65 Å Resolution	J. Biochem.	147	905-915	2010
Matsushima A, Takakura S, Fujihara N, Saito T, Ito Y, Iinuma Y, Ichiyama S.	High prevalence of mutators among <i>Enterobacter cloacae</i> nosocomial isolates and their association with antimicrobial resistance and repetitive detection.	Clin Microbiol Infect	16	1488-1493	2010
Shirano M, Takakura S, Yamamoto M, Matsumura A, Matsushima A, Nagao M, Fujihara N, Saito T, Ito Y, Iinuma Y, Shimizu T, Fujita N, Ichiyama S	Regional spread of vanA- or vanB-positive <i>Enterococcus gallinarum</i> in hospitals and long-term care facilities in Kyoto prefecture, Japan.	Epidemiol Infect	139	430-436	2010

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
Nagao M, Iinuma Y, Suzuki M, Matsushima A, Takakura S, Ito Y, Ichiyama S.	First outbreak of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> USA300 harboring the Panton-Valentine leukocidin genes among Japanese healthcare workers and hospitalized patients.	Am J Infect Control	38	37-39	2010
Li Y, Tomita H, Lv Y, Liu J, Xue F, Zheng B, and Ike Y	Molecular characterization of <i>erm(B)</i> - and <i>mef(E)</i> -mediated erythromycin-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> in China and complete DNA sequence of Tn2010	Journal of Applied Microbiology,	110	254-265	2010
Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Tanaka M, Narahara K, Saito N, Kirikae T.	Development of an immunochromatographic assay for the rapid detection of AAC(6)-Iae-producing multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	J Antimicrob Chemother.	65(7)	1382-1386	2010
Takaya A, Kitagawa N, Kuroe Y, Endo K, Okazaki M, Yokoyama E, Wada A, Yamamoto T	Mutational analysis of reduced telithromycin susceptibility of <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolated clinically in Japan	FEMS Microbiol. Lett	307	87-93	2010
Chang B, Otsuka T, Iwaya A, Okazaki M, Matsunaga S, Wada, A.	Isolation of <i>Streptococcus pneumoniae</i> serotypes 6C and 6D from the nasopharyngeal mucosa of healthy Japanese children.	Jpn J Infect Dis	63	381-383	2010

IV. 研究成果の刊行物・別冊・資料

RESEARCH LETTER

RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms

Jun-Ichi Wachino, Keigo Shibayama, Kouji Kimura, Kunikazu Yamane, Satowa Suzuki & Yoshichika Arakawa

Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

Correspondence: Yoshichika Arakawa, Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan. Tel.: +81 42 561 0771, ext. 3500; fax: +81 42 561 7173; e-mail: yarakawa@nih.go.jp

Received 28 May 2010; revised 30 June 2010; accepted 15 July 2010.
Final version published online 16 August 2010.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2010.02068.x

Editor: Mark Enright

Keywords: aminoglycoside; 16S rRNA methyltransferase; RmtC.

Abstract

Seven plasmid-mediated 16S rRNA methyltransferases (MTases), RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, ArmA, and NpmA, conferring aminoglycoside resistance have so far been found in Gram-negative pathogenic microorganisms. In the present study, by performing an RNase protection assay, primer extension, and HPLC, we confirmed that RmtC indeed methylates at the N7 position of nucleotide G1405 in 16S rRNA as found in ArmA and RmtB. RmtC has an MTase activity specific for the bacterial 30S ribosomal subunit consisting of 16S rRNA and several ribosomal proteins, but not for the naked 16S rRNA, as seen in ArmA, RmtB, and NpmA. All seven 16S rRNA MTases have been found exclusively in Gram-negative bacilli to date, and no plasmid-mediated 16S rRNA MTase has been reported in Gram-positive pathogenic microorganisms. Thus, we checked whether or not the RmtC could function in Gram-positive bacilli, and found that RmtC could indeed confer high-level resistance to gentamicin and kanamycin in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. 16S rRNA MTases seemed to be functional to some extent in any bacterial species, regardless of the provenance of the 16S rRNA MTase gene responsible for aminoglycoside resistance.

Introduction

Large amounts of aminoglycosides have been used thus far for the treatment of infections caused by Gram-negative and Gram-positive bacteria in clinical settings and for growth promotion in livestock-farming settings. On the other hand, bacteria have acquired various resistance mechanisms to cope with aminoglycosides.

Plasmid-mediated 16S rRNA methyltransferases (MTases), which confer a high level of resistance to various aminoglycosides, especially to those containing 4,6-disubstituted 2-deoxystreptamine (2-DOS), have been widely distributed among pathogenic microorganisms belonging to the family *Enterobacteriaceae* and glucose nonfermentative Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical and livestock-farming environments (Chen *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2007). RmtA (Yokoyama *et al.*, 2003), RmtB (Doi *et al.*, 2004), RmtC (Wachino *et al.*, 2006), RmtD (Doi *et al.*, 2007), RmtE (Davis *et al.*, 2010), ArmA (Galimand *et al.*,

2003), and NpmA (Wachino *et al.*, 2007) have so far been reported as plasmid-mediated 16S rRNA MTases conferring aminoglycoside resistance, but methylation sites have only been determined as G1405 for RmtB and ArmA, and A1408 for NpmA (Liou *et al.*, 2006; Perichon *et al.*, 2007; Wachino *et al.*, 2007). As for RmtA, RmtC, RmtD, and RmtE, the site of methylation in the 16S rRNA has not been described.

Plasmid-mediated 16S rRNA MTases have only been found in Gram-negative pathogenic bacteria, and not in Gram-positives. It remains controversial whether or not 16S rRNA MTase as described above is functional and confers aminoglycoside resistance in Gram-positives as well as in Gram-negatives, although it was revealed previously that *armA* controlled under the original promoter could confer aminoglycoside resistance in *Bacillus subtilis* (Liou *et al.*, 2006). Therefore, in this study, we aimed to determine exactly the residue modified by RmtC, and investigated whether RmtC can provide aminoglycoside resistance in Gram-positive pathogens.

Materials and methods

Production and purification of RmtC

The *rmtC* gene was amplified with the P1 primer (5'-GGA ATT CCA TAT GAA AAC CAA CGA TAA TT-3': NdeI restriction site added), the P2 primer (5'-GCT CTA GAT TAC AAT CTC GAT ACG ATA-3': XbaI restriction site added), and the pET-His-*rmtC* vector (Wachino *et al.*, 2006) as a DNA template. The amplified fragments were digested with endonucleases, cloned into pCold-II vector (Takara), and introduced into *Escherichia coli* BL21(DE3)-pLysS. Cells were grown until $A_{600\text{nm}}$ 0.5 at 37 °C in Luria-Bertani medium. After the addition of isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (0.5 mM), cells were grown at 15 °C for 24 h, and disrupted with a French press. Protein purification using nickel-nitrilotriacetic acid was performed according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). The eluted recombinant protein was loaded on size-exclusion chromatography column Superdex™ 200 10/300GL (GE Healthcare), and eluted with 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl and 1 mM dithiothreitol. Finally, the purified protein (His₆-RmtC) was concentrated using an Amicon Ultra-15 Centricon (Millipore). The purity of the protein was proven by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

In vitro methylation of 16S rRNA

Ribosomal subunits were extracted from *E. coli* JM109 using ultracentrifugation with the sucrose density gradient. Methylation assay was performed as described elsewhere (Wachino *et al.*, 2007). In brief, purified His₆-RmtC, S-adenosyl-L-[methyl-³H]methionine (GE Healthcare), and the substrate (30S ribosomal subunit, 50S ribosomal subunit, or naked 16S rRNA) were mixed and incubated at 35 °C. Aliquots were taken at 0, 5, 15, and 30 min, and purified using an RNeasy mini kit (Qiagen), according to the instructions provided by the manufacturer. The radioactivity of the samples was determined with a scintillation counter.

RNase protection assay

[³H]-methyl-labeled 16S rRNA produced by RmtC was hybridized with oligonucleotides spanning the A-site of *E. coli* 16S rRNA. The oligonucleotides used were the same as those in our previous study (Wachino *et al.*, 2007). RNaseA (Wako) was added and incubated at 37 °C. The reaction was quenched by the addition of ice-cold trichloroacetic acid (TCA). The samples were passed through cellulose nitrate filters and washed with ice-cold trichloroacetic acid (TCA). The filter was dissolved in scintillation

fluid, and the radioactivity of the samples was measured using a scintillation counter.

Primer extension analysis

The 16S rRNA was extracted from *E. coli* JM109 (pBC-KB1) that expresses RmtC. The recombinant plasmid, pBC-KB1, was constructed in our previous study (Wachino *et al.*, 2006). The 16S rRNA was then treated with borohydride and aniline as described previously (Liou *et al.*, 2006). The primer extension was performed using the primer (5'-biotin CCA ACC GCA GGT TCC CCT ACG G-3') complementary to nucleotide 1530–1509 positions. The cDNA transcripts were analyzed using PAGE.

Detection of 7-methylguanosine (m⁷G) by HPLC

The 16S rRNA of three *E. coli* strains, BW25113, BW25113 Δ *gidB*, and BW25113 Δ *gidB*(pBC-KB1) expressing RmtC, were extracted and treated with nuclease P1 (Wako) and alkaline phosphatase (Takara). The resulting product was analyzed using HPLC with an HRC-ODS column [4.6 mm (inner diameter) by 250 mm; Shimadzu].

Introduction of *rmtC* into Gram-positive microorganisms

The *rmtC* gene and its promoter region were amplified with the P3 primer (5'-CGC GGA TCC AGT GTA TGA AAA ATG TCT GG-3': BamHI restriction site added) and the P4 primer (5'-CCC AAG CTT GGT GTG TTA GAA TTT GCC T-3': HindIII restriction site added), and then cloned into the pHY300PLK shuttle vector (Takara). The recombinant plasmid, pHY300*rmtC*, was introduced into *B. subtilis* strain ISW1214 and *Staphylococcus aureus* strain RN4220 by electroporation. The *rmtC* gene was also amplified with the P5 primer (5'-TTT TTC GGC CGG CAT GAA AAC CAA CGA TAA TT-3': Eco52I restriction site added) and the P6 primer (5'-ATT TTT CGC GAC AAT CTC GAT ACG ATA AA-3': NruI restriction site added), cloned into *E. coli*-*S. aureus* shuttle expression vector pMGS100 (Fujimoto & Ike, 2001), and expressed in *S. aureus* RN4220. MICs of kanamycin, gentamicin, and neomycin for the transformants were measured according to the protocol recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (2009).

Results and discussion

Assay of the methylation activity of RmtC

In the previous study (Wachino *et al.*, 2006), we purified C-terminal histidine-tagged RmtC with the combination of a pET29a vector and an *E. coli* BL21(DE3)pLysS. However, only approximately 1 mg of protein was purified from a 1 L culture. Therefore, we generated another expression

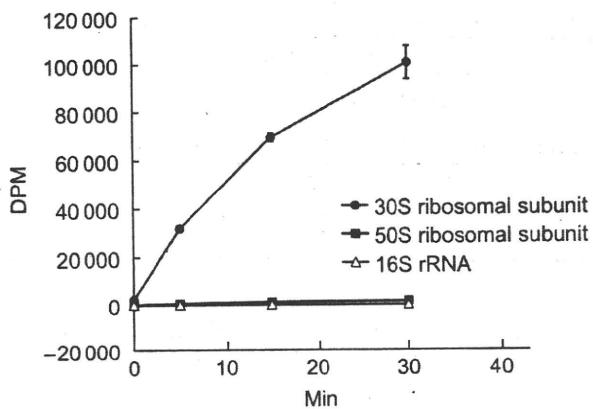


Fig. 1. Methyl acceptor activity of the 30S ribosomal subunit, the 50S ribosomal subunit, and naked 16S rRNA using [^3H]-S-adenosyl-L-methionine and purified His₆-RmtC. Values are the averages of three measurements. Error bars indicate SDs.

construct consisting of a pCold-II vector and an *E. coli* BL21(DE3)pLysS to improve the protein purification productivity. Optimized conditions yielded 8 mg of purified protein per 1 L culture, and its purity seemed very high on SDS-PAGE (data not shown). The native molecular weight (*M*) of the His₆-RmtC protein was determined to be approximately 34 000 by gel filtration chromatography.

Purified His₆-RmtC protein specifically had an MTase activity against an assembled 30S ribosomal subunit consisting of 16S rRNA and several ribosomal proteins, but no methylation activity was detected against protein-free 16S rRNA in the presence of the methyl group donor S-adenosyl-L-methionine (Fig. 1). This substrate specificity of RmtC to the 30S ribosomal subunit, not to naked 16S rRNA, has been commonly observed among 16S rRNA MTases such as ArmA (G1405), RmtB (G1405), Sgm (G1405), RsmF[YebU] (C1407), and NpmA (A1408), which methylate the nucleotide within the ribosomal A-site (Andersen & Douthwaite, 2006; Liou et al., 2006; Wachino et al., 2007; Savic et al., 2008; Cubrilo et al., 2009; Schmitt et al., 2009). The specific activity of these 16S rRNA MTases for the 30S ribosomal subunit would indicate that ribosomal proteins play a crucial role in the precise substrate recognition.

Determination of methylation site by RmtC

To determine the precise nucleotide position modified by RmtC, we used three approaches: RNase protection assay, primer extension, and HPLC. [^3H]-methyl-labeled 16S rRNA modified by RmtC *in vitro* was hybridized with oligonucleotides complementary to the rRNA region, and treated with RNaseA, and the radioactivity was measured to confirm the region to which the [^3H]-methyl group was added. The hybridization of oligonucleotides spanning from G1392 position to the G1421 position was able to maintain

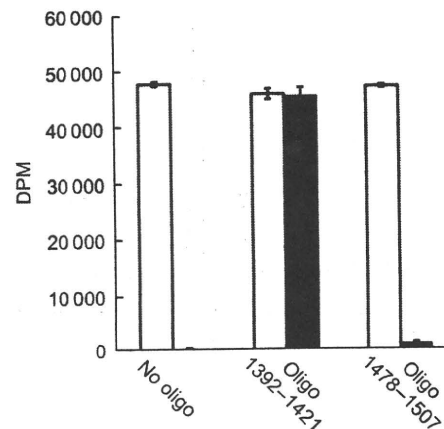


Fig. 2. RNase protection assay with [^3H]-methyl-labeled 16S rRNA and DNA oligonucleotides complementary to the regions from positions 1392 to 1421 or positions 1478 to 1507. Values are the averages of three measurements. Error bars indicate SDs. Open bars, undigested; solid bars, digested with RNaseA.

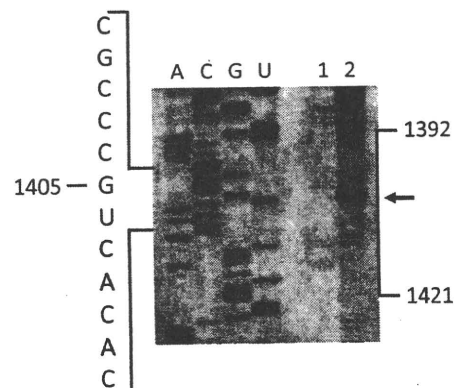


Fig. 3. Primer extension analysis of methylated 16S rRNA by RmtC. Lanes: 1, without aniline/borohydride treatment; 2, aniline/borohydride treatment. Dideoxy sequencing lanes (C, A, U, and G) were generated with the amplified PCR products of *Escherichia coli* 16S rRNA gene as the template. Primer extension termination at position U1406 is indicated by an arrow.

the radioactivity after RNaseA treatment (Fig. 2), suggesting that the nucleotide residue methylated by RmtC was located between G1392 and G1421 of 16S rRNA.

A primer extension analysis was performed as the second assay for the determination of the methylated position. The 16S rRNA prepared from the 30S ribosomal subunit of *E. coli* JM109 expressing RmtC was treated with NaBH₄/aniline before the primer extension reaction, and the site of methylation was determined by acrylamide gel electrophoresis. By primer extension analysis, one reverse transcription stop was observed at position U1406 as a result of β -elimination at the 3'-end of the N7-position of the nucleotide G1405 (Fig. 3). The termination of transcription at U1406 was not observed without the treatment with NaBH₄/aniline (Fig. 3). Thus,