

表 3 ORF 保有パターンから遺伝子型コードへの変換方法と図 1 菌株番号1のコード化の例

Reaction mixture 1				
Marker	1			
islet-1	0 ×	512 =	0	コード 1 - 1 genomic islet
islet-2	1 ×	256 =	256	
islet-3	0 ×	128 =	0	
islet-4	1 ×	64 =	64	
islet-5	1 ×	32 =	+ 32	
			352	
Vim	0 ×	64 =	0	コード 2 - 1 phage + vim
phage-1	0 ×	32 =	0	
phage-2	0 ×	16 =	0	
phage-3	0 ×	8 =	+ 0	
			0	
Reaction mixture 2				
marker	1			
islet-6	1 ×	16 =	16	コード 1 - 2 genomic islet
islet-7	1 ×	8 =	8	
islet-8	1 ×	4 =	4	
islet-9	1 ×	2 =	2	
islet-10	0 ×	1 =	+ 0	
			30	
phage-4	0 ×	4 =	0	コード 2 - 2 phage + imp
phage-5	0 ×	2 =	0	
imp	0 ×	1 =	+ 0	
			0	
コード 1 = コード 1 - 1 + コード 1 - 2 = 382				
コード 2 = コード 2 - 1 + コード 2 - 2 = 0				

表 4-1 コード 1 と ST 型が 1 対 1 で対応した遺伝子型

コード 1	ST 型	株数	コード 1	ST 型	株数
34	ST195dlv	1	316	STnew	2
44	ST262,423,822,899slv	1	318	ST245	1
45	STnew	1	392	ST313	1
46	ST241/471dlv	2	410	ST1076	6
56	ST966	1	554	ST233	4
62	ST412	1	572	ST282slv	2
63	ST272	1	574	ST360	2
70	ST854slv	1	604	ST687slv	1
92	ST433/ST552 dlv	1	634	ST242	1
108	ST654	1	634	ST242	4
118	ST879 slv	1	636	ST155	5
123	ST464slv	1	637	new	1
125	ST635	1	646	ST357	6
199	ST620	1	656	ST532	2
203	ST308	4	706	ST319	2
207	ST235	9	822	ST198slv	1
249	ST164	1	823	ST274	4
278	STnew	1	886	ST906dlv	1
287	ST875 slv	1	887	ST381	1
307	ST909 dlv	1	894	ST132	2
311	ST209	1	974	ST298	2
314	ST260 sllv	1		合計	85

表 4-2 コード 1 と ST 型が 1 対 1 で対応しない遺伝子型

コード 1	ST 型	株数
60	STnew	1
60	ST262	2
122	ST859	1
122	ST583/887/988dlv	2
124	ST641	1
124	ST988	1
335	ST606	1
367	ST606	1
382	ST852slv	1
382	ST244	1
383	ST244	1
573	ST470dlv	1
573	ST179slv	4
575	ST17	2
575	ST991slv	2
830	ST645	1
830	ST254	1
	合計	24

図1 新規開発法の電気泳動パターン

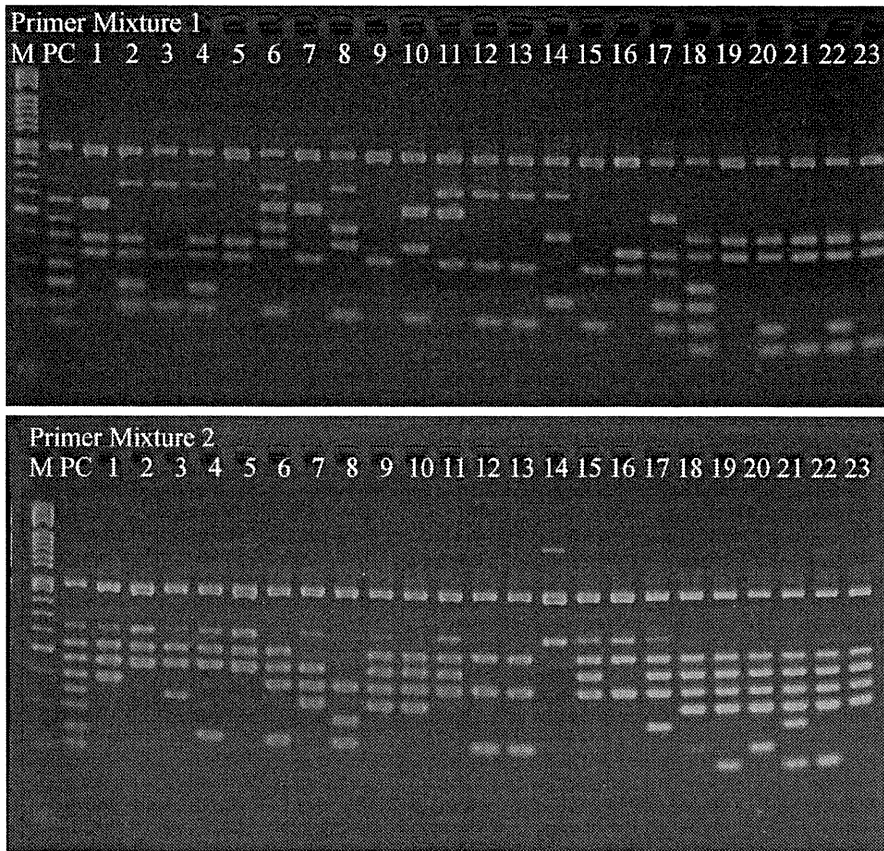
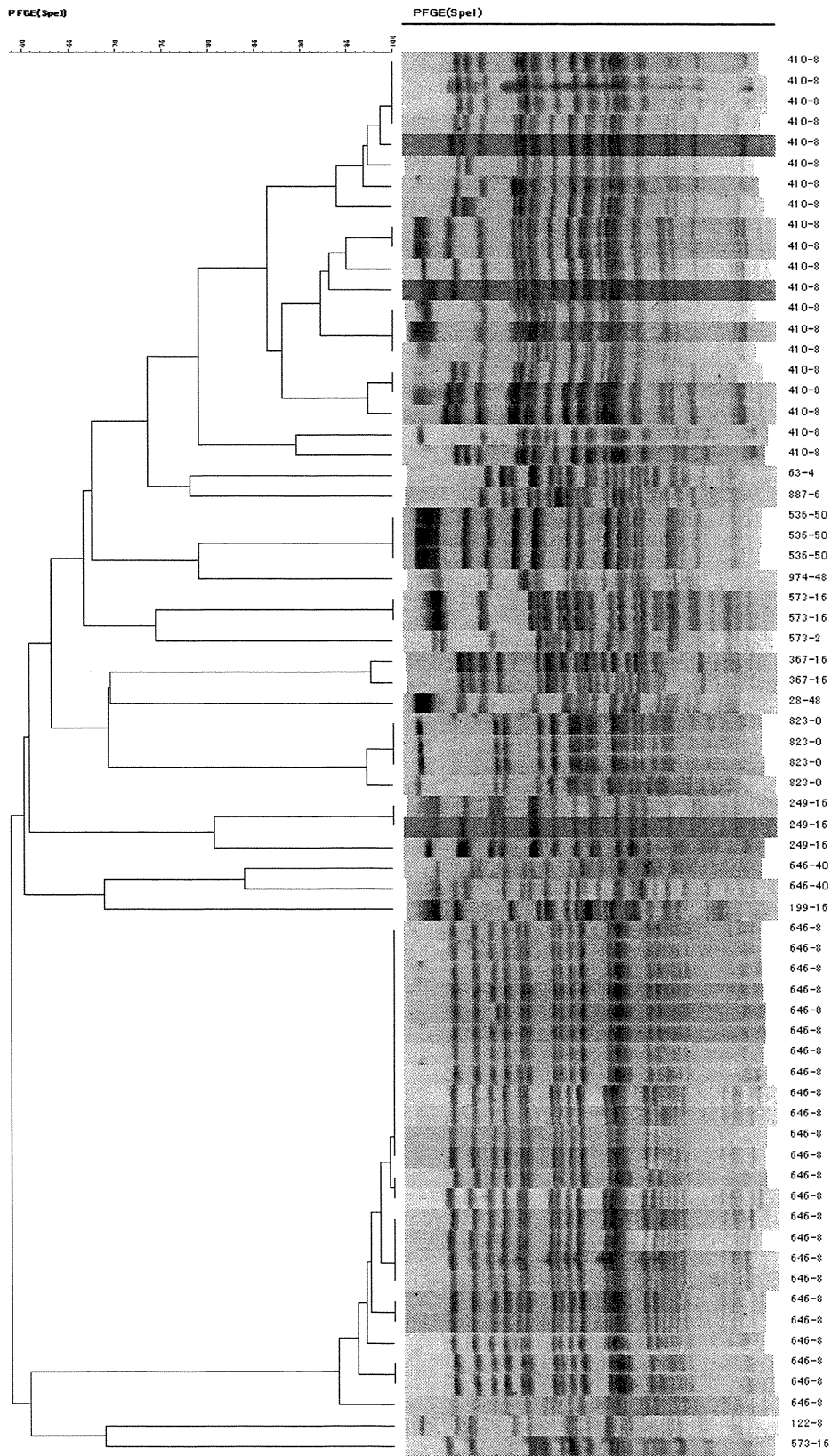


図2 集団感染疑い時収集株の PFGE パターンと新規開発法による遺伝子型コード



グラム陽性菌(腸球菌、黄色ブドウ球菌)の多剤耐性菌に関する研究

研究分担者 池 康嘉 (群馬大学大学院医学研究科細菌学講座)

研究要旨

VanA 型 VRE の VanA 遺伝子をコードとする Tn1546(10.85kb) の IS 挿入、欠損、アミノ酸置換等の遺伝子構造解析から、これまで日本で分離されたバンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin resistant enterococci; VRE)の Tn1546 の構造は、12 型に分類された。これらは、欧米で報告されているもの、東アジアで報告されているもの、日本特有のものが存在する。今回、海外(米国)帰国患者から分離された *E. faecium* VanA を解析し、欧米で分離される型の Tn1546 の構造をしていた。

日本で分離された *E. faecium* VanA VRE から、VRE の病原性因子(定着因子)であるバクテリオシンを解析し、新型のバクテリオシン(Bac51)を発見した。このバクテリオシンは接合伝達性プラスミド(6kbp)にコードされ、精製したバクテリオシンは、これまで報告のない静菌的活性を示すバクテリオシンであった。

研究協力者

富田 治芳 群馬大学 細菌学 教授
谷本 弘一 同上 薬剤耐性菌実験施設 准教授
野村 隆浩 同上 細菌学 技術専門員
山下 均 同上 大学院生
堤 裕子 同上 大学院生

A. 研究目的

1988年と1989年に欧米におけるVREの最初の報告がされた。VREの分離と増加の要因は、米国ではバンコマイシンの使用量の増加が医療界に広がり、EU各国では家畜、特に養鶏においてグリコペプチド系のアボパルシンを成長促進の目的で使用したことにより、家畜や一般の人々の腸管にVREが定着した。いずれもグリコペプチド系の使用量の増加により、それぞれの環境でVREが選択的に増加したものである。

米国のVRE分離率は臨床分離腸球菌の約30%と推測されている。アジアでは韓国において約10~15%と推測されている。日本におけるVREの臨床分離頻度は他の国々と比較して例外的に低く、大学附属病院等の教育病院においてはほとんど分離されない。しかしながら、毎年地域においてVREの散発的な分離と院内感染が発症しVREの分離は、増加傾向にある。分離頻度の比較的少ない状況におけるこれらのVREは、日本のVREの標準株(リファランス株)になり得る。そのため、本研究においては日本で散発的に分離されるVREの形質、遺伝子構造を解析することにより、日本のVREのリファランス構造を目的とする。また、VREが保持するプラスミドの構造、伝達性等、解析を行い、プラスミド上の遺伝子特性の研究を行った。

本年度は、海外(米国)帰国者から分離された

VREと日本で分離されたVREで発見された新型バクテリオシンの研究を報告する。

B. 研究方法

VanA型*E. faecium* (VanA VRE)株を使用。用いた実験株は*E. faecium* BM4105RF (Rif^r, Fus^r)、*E. faecium* BM4105SS (Str^r, Spc^r)、*E. faecalis* FA2-2RF、*E. faecalis* JH2SSである。薬剤耐性(プラスミド)の接合伝達、DNA解析方法等は既報に従った。バクテリオシン定性は、軟寒天重層法、液体培地での定量を行った。バクテリオシン精製はHis-Tag法を用いた。

倫理面への配慮

C. 研究結果

1. 海外帰国患者からVREの解析

1) VREの分離

海外帰国入院患者(58才)から分離されたVanA型VREは、*E. faecium*(IMJ-16)であった。

2) VanA遺伝子の接合伝達

E. faecium(IMJ-16)を供与菌として、*E. faecalis* FA2-2、*E. faecium* BM1405RFに接合伝達をおこなった。Broth mating, solid surface mating, いずれもVanAは、接合伝達しなかった。

3) MLST解析

一般的な臨床分離*E. faecium* vanAが属するST17(CC17)に分類された。

4) Tn1546(10.85kb)のPCR解析

Tn1546を上流から1~10の領域に分け、PCR解析を行った。1番目が検出されず、6と8番目が野性型より長くなっていた。

5) Tn1546 の塩基配列解析

Tn1546 のクラスターを 20 個に分け、シークエンスを行った、これまで日本で分離された型の中で、G 型に分類された(図)。その構造は、Tn1546 の ORF1 の上流に IS1216V が挿入され、挿入部位から上流が欠損していた。また、*VanS* *VanH* の間に IS 1216 1, *VanX* と *VanY* の間に IS1216V が挿入されていた。

2. 日本で分証された VanA 型 *E. faecium* から発見された新型バクテリオシンの研究

1) *E. faecium*, (VanA), VRE のバクテリオシン伝達性。6 株の *E. faecium* VRE (VanA) のうち 5 株は Van, Teic, Gen, Kan Erm, Tet Amp でバクテリオシン活性を示した。

2) バクテリオシンの接合伝達性

Gen^r を遺伝マーカーとして、*E. faecium* BM4105RF solid mating を行った。Gen^r は供与菌当たり約 10⁻⁴ の頻度で接合伝達した。それぞれの株で Gen^r 株のうち、75~95% の株はバクテリオシン活性を示した。バクテリオシン活性を持つ菌は 6 kb のプラスミドのみを保持していたが、バクテリオシン活性のない菌は、プラスミドを保持していなかった。この結果、6 kb のプラスミドがバクテリオシンをコードしていることが推測された。

代表株として、*E. faecium* VRE38 を用いた。*E. faecium* VRE38 から分離されたプラスミド PHY(6kb) と名付けた。*E. faecium* BM4105RF(PHY(6kb)) は、*E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* にバクテリオシン活性を示した。

3) PHY(6kb) の遺伝学的解析とバクテリオシン遺伝子 *bac51* のクローニング。

PHY(6kb) は、9 個の ORF をコードとしていて、そのうち PHY(6kb) の遺伝子地図の ORF1, ORF2 がそれぞれバクテリオシン遺伝子 *bacA*(144aa) と免疫遺伝子 *bacB*(57aa) をコードしていて、*bacA* 上流には転写開始領域が存在したが、*bacB* 上流には、それは存在しなかった。

4) *bac51* の精製とバクテリオシン活性

bac51 を BacA-His 方法で精製し、バクテリオシン活性を調べた結果、*bac51* は静菌的、活性を示す新型バクテリオシンであることが解った。

D. 考察

1. これまで、日本で分離された、VanA 型 VRE

は、Tn1546 の塩基配列の解析による遺伝子構造解析から、12 の型に分類されたこれらの株の中で、VanS にアミノ副置換がある型が、3 型 (typeA~C) 存在する。特に VanS の 3 ヶ所に変異がある株は、台湾、タイ等の家畜(トリ)から分離される VRE と同型である。また、IS256 が挿入された日本特異的な型も分離されている。これらの VRE 型は日本の VRE のリファランスとなり得る。

2. *E. faecium* VanA VRE から新型バクテリオシン Bac51 が発見された、バクテリオシンは腸球菌において、薬剤耐性と共に腸球菌が病巣で生存するために、他菌に対して優位な性質を提供する。臨床分離、VRE の多くはバクテリオシンを生産する。これまでに新型のバクテリオシンを発見してきたが、Bac51 はこれまで報告のない静菌的活性をもつ、バクテリオシンで 6kbp の伝達性プラスミド上にバクテリオシン遺伝子が存在した。

E. 結論

海外帰国患者の VanA VRE の遺伝子構造は、これまで日本で分離された VRE の遺伝子の一つに分類された。VanA VRE から新型バクテリオシン Bac51 を発見した。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) H. Yamashita, H. Tomita, T. Inoue and Y. Ike Genetic Organization and Mode of Action of a Novel Bacteriocin, Bacteriocin 51: Determinant of VanA-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011 55(9):4352-4360

(2) H. Tomita, Jang-Jih Lu, and Y. Ike High Incidence of Multiple-Drug Resistant Pheromone-Responsive Plasmids and Evidence of Transmissions of VanA-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* from Livestock to Human. *Antimicrob. Agents Chemother.* revised.

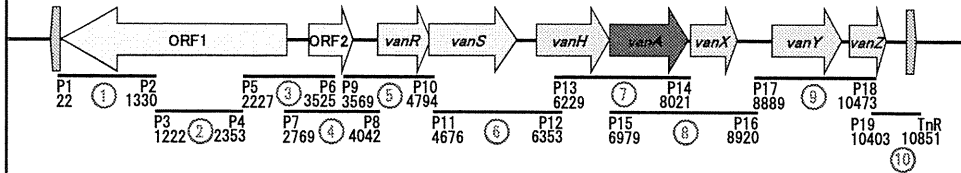
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

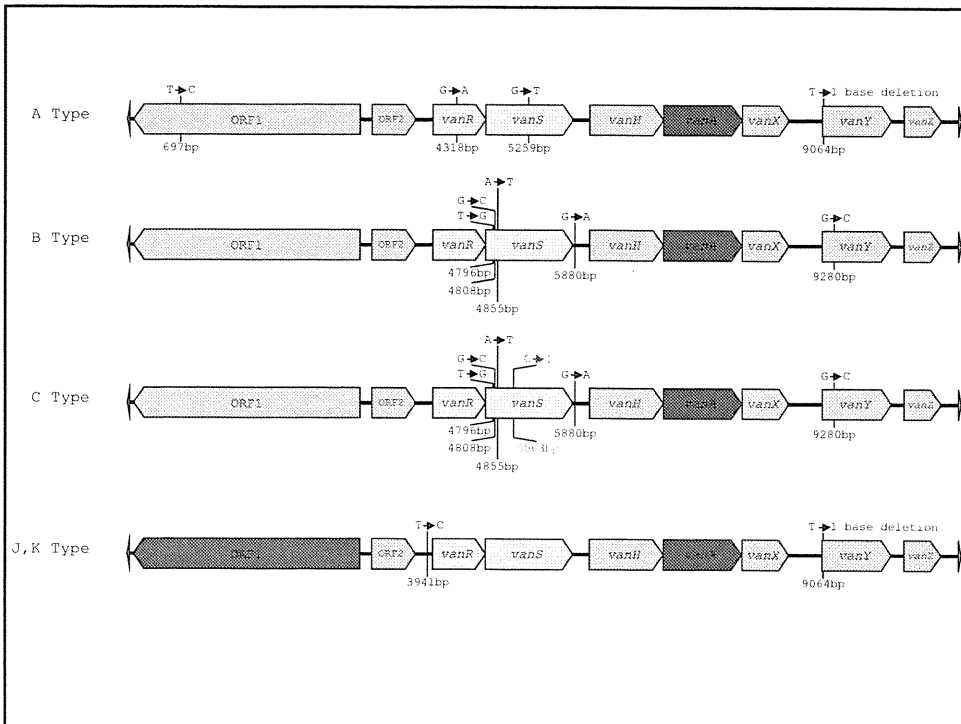
図 日本で分離されたVanA型VREのTn1546の遺伝子構造

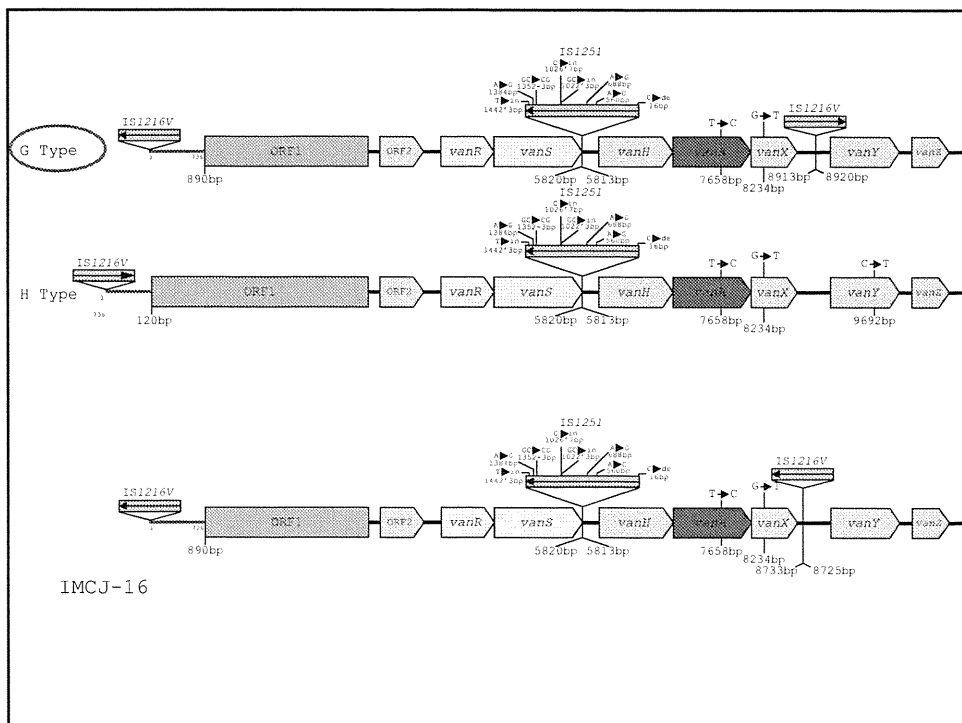
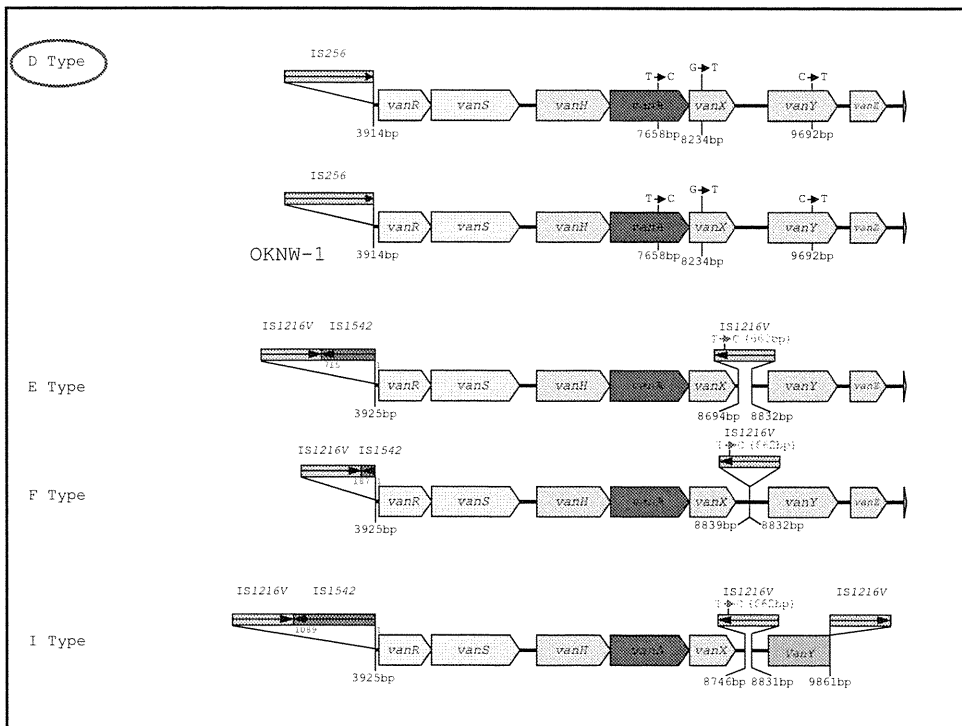
BM4147 (Tn1546)



strain No.	Species	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
IMCJ-16	<i>E. faecium</i>	-	+	+	+	+	++	+	++	+	-

strain No.	Species	MLST(Allelic profile)							ST	CC
		<i>adk</i>	<i>purK</i>	<i>pstS</i>	<i>atpA</i>	<i>gdh</i>	<i>ddl</i>	<i>gyd</i>		
IMCJ-16	<i>E. faecium</i>	1	1	1	1	1	14	1	17	17





多剤耐性緑膿菌の院内感染対策に関する研究

研究分担者 切替 照雄 （国立国際医療研究センター 感染症制御研究部）

研究要旨

本研究では、多剤耐性緑膿菌の院内感染の実態を明らかにすること、ならびに、多剤耐性緑膿菌臨床分離株より流行性の薬剤耐性因子を同定し、それらを標的とする多剤耐性緑膿菌の迅速検出法を開発することを目的とした。2009年から2010年に全国の医療施設から集められた多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析を行なった結果、既知のアミノグリコシド耐性因子 AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌 NCGM2.S1 株が属するクローンとは異なる PFGE パターンを示す新興クローンを同定した。新興クローンは全て呼吸器検体であると共に、カルバペネム系薬、アミノグリコシド系薬およびキノロン系薬に高度多剤耐性を示した。また、NCGM2.S1 株および新興クローンの一つ NCGM1179 株のゲノムをそれぞれ次世代シーケンサーで解析し、全塩基配列を決定した。さらに、IMP/AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌を迅速、簡便に検出できる高感度イムノクロマトキットを開発することができた。これらの研究成果は今後、多剤耐性緑膿菌の早期発見および感染症対策に大きく貢献することが期待される。

研究協力者

切替 照雄 （国立国際医療研究センター
感染症制御研究部）

秋山 徹 （同上）

安藤 公英 （同上）

島田 佳世 （同上）

多田 達哉 （同上）

賀来 満夫 東北大学大学院医学系研究科

霧島 正浩 株式会社 BML 総合研究所

/AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌クローンの一つ NCGM2.S1、および2010年に同定された新興クローンの一つ NCGM 1179株の全塩基配列を次世代シーケンサーで解析した。

・簡易迅速診断法の開発

我々は、AAC(6')-Iae 産生株および IMP 産生株を簡便かつ迅速にスクリーニングする為の方法として、メタロβラクタマーゼ IMP-1 およびアミノグリコシドアセチル化酵素 AAC(6')-Iae に対するモノクローナル抗体を作製し、AAC(6')-Iae/IMP イムノクロマトプレートの作成を試みた。

A. 研究目的

本研究では、多剤耐性緑膿菌の院内感染の実態を明らかにすること、ならびに、多剤耐性緑膿菌臨床分離株の分子疫学解析を行うことにより、流行性の薬剤耐性因子を同定し、同菌の早期検出やモニタリングに有用な簡便かつ迅速な薬剤耐性菌検出法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

・多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析

2009年8月から2010年4月まで全国の医療施設から集められた多剤耐性緑膿菌臨床分離株 217 株に対して PFGE パターン解析、薬剤耐性遺伝子解析および MLST 解析を行った。

・高度多剤耐性緑膿菌のゲノム解析

現在、全国の医療施設で分離される IMP-1

倫理面への配慮

研究対象は、患者情報と完全に切り離された臨床分離株を使用する。本研究内容は、疫学研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省）の対象外である。

C. 研究結果

・メタロβラクタマーゼ/ AAC(6')-Iae 産生新規クローンの同定

2009年8月から2010年4月まで全国の医療施設から集められた多剤耐性緑膿菌臨床分離株 217 株に対して分子疫学解析を行なった結果、全国の医療施設で分離される IMP-1/AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌 145 株の内、NCGM2.S1 が属す

るクローンとは異なる PFGE パターンを示す IMP-1 /AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌の新興クローン 16 株を同定した(図 1)。NCGM2.S1 が属するクローンは 17 都道府県から分離されたのに対し、新興クローンは北海道から沖縄を含む 9 道府県から分離された(図 2)。また、新興クローンに属する臨床分離株は全て呼吸器から分離され、ST991、O-18 であった。さらに、3 剤全てに高度耐性を示した(表 1)。

・高度多剤耐性緑膿菌のゲノム解析

次世代シーケンサーにより NCGM2.S1 および NCGM1179 の全塩基配列を決定した。比較ゲノム解析の結果、NCGM2.S1 株のインテグロン *In113* が *oprD* に挿入されていることが明らかとなった(図 3)。

・簡易迅速診断法の開発

メタロβラクタマーゼ IMP-1 およびアミノグリコシドアセチル化酵素 AAC(6')-Iae に対するモノクローナル抗体を作製し、IMP/AAC(6')-Iae イムノクロマトキットを作製した(図 4)。このキットは薬 10⁶ 個の菌があれば IMP/AAC(6')-Iae 産生菌を 15 分で判定可能であると共に、すべての IMP 亜型を検出できることが明らかとなった。

D. 考察

IMP/AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌 NCGM2.S1 株が属するクローンが日本全国の医療施設から検出されることを明らかにしてきた。その中で、NCGM2.S1 株が属するクローンとは異なる IMP/AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌の新興クローンが北海道および沖縄を含む 9 道府県から分離された。NCGM2.S1 株が属するクローンは尿路検体が多いのに対し、新興クローンは呼吸器系から分離され、3 剤全てに高度多剤耐性を示したことから、今後、さらに広まっていく可能性が示唆された。

E. 結論

全国の医療施設から分離される高度多剤耐性緑膿菌は呼吸器由来検体の割合が多くなり、呼吸器由来の新興クローンも確認された。また、本研究で開発した迅速診断キットは、院内感染伝播防止対策に役立つと考えられる。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

・Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Kirikae T.

Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo-β-lactamases that mediate cabapenam resistance in *Pseudomonas*. *J Microbiol Methods*. 87(3): 330-337, 2011.

・Tada T, Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Genome sequence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* NCGM1179. *J Bacteriol*. 193(22): 6397, 2011.

・Miyoshi-Akiyama T, Kuwahara T, Tada T, Kitao T, Kirikae T. Complete genome sequence of highly multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* NCGM2.S1, a representative strain of an endemic cluster in Japan. *J Bacteriol*. 193(24): 7010, 2011.

・Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo-β-lactamases and AAC(6')-Iae in Japan. *Int J Antimicrob Agents*. (Accepted)

・Kirikae T., Mori-Yoshikawa N, Arakawa Y. Isolation rates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. at medical facilities in Japan. *BMC Infect Dis*. (submitted)

2. 学会発表

・Tomoe Kitao-Ando, Tohru Miyoshi-Akiyama, Masashi Tanaka, Kenji Narahara2, Masahiro Shimojima, Teruo Kirikae Immunological detection system for bacteria producing metallo-β-lactamase IMP、第 84 回細菌学会、9 月、札幌

・多田達哉・北尾公英・島田佳世・秋山徹・切替昭雄。医療施設で新興する高度多剤耐性緑膿菌株の解析、第 40 回薬剤耐性菌研究会、平成 23 年 12 月、渋川

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許名称:モノクローナル抗体、それを用いる検査装置(特願:2011-109456)

出願日:2011.5.16

発明者:秋山 徹、安藤公英、斉藤暢子、切替昭雄、田中雅士、榎原謙次

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

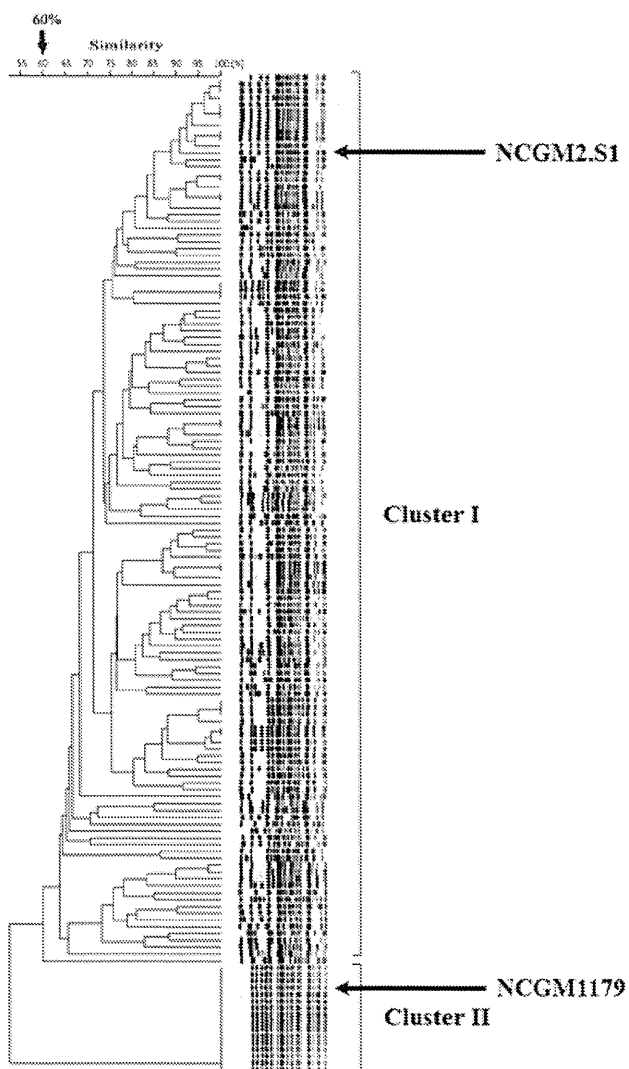


図1 IMP/AAC(6')-IacE 産生多剤耐性緑膿菌 145 株の PFGE パターン

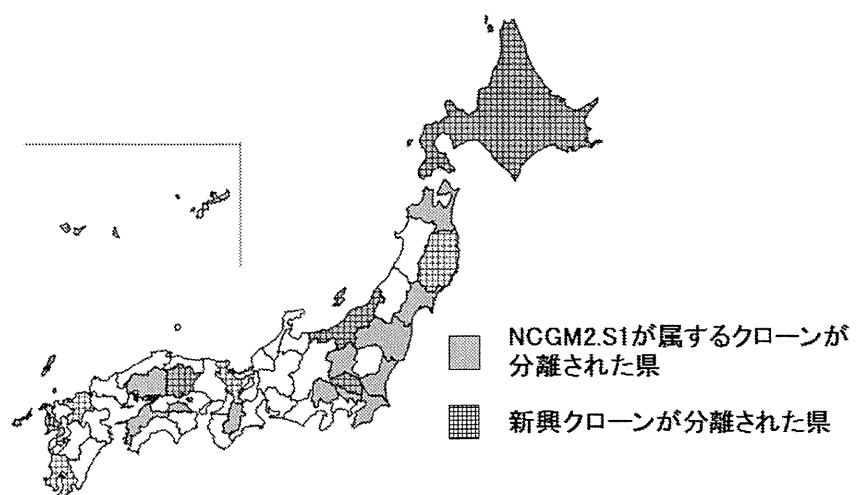


図2 NCGM2.S1 が属するクローンおよび新興クローンの地理的分布

検体番号	都道府県	Single			Multiple lines		antibiotic genes		MIC [μ g/ml]		
		lae	lae	IMP	aac(6')	blaIMP	IPM	AMK	CPFX		
AP721813	岡山	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72075	埼玉	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72100	鹿児島	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72117	岩手	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72124	北海道	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72127	北海道	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72159	埼玉	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72187	沖縄	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72189	新潟	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72204	新潟	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72224	京都	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72293	福岡	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72295	福岡	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72296	福岡	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72301	福岡	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		
AP72303	福岡	(+)	(+)	(+)	lae	IMP-1	128	64	>128		

表1 新興クローン16株の薬剤耐性プロファイル

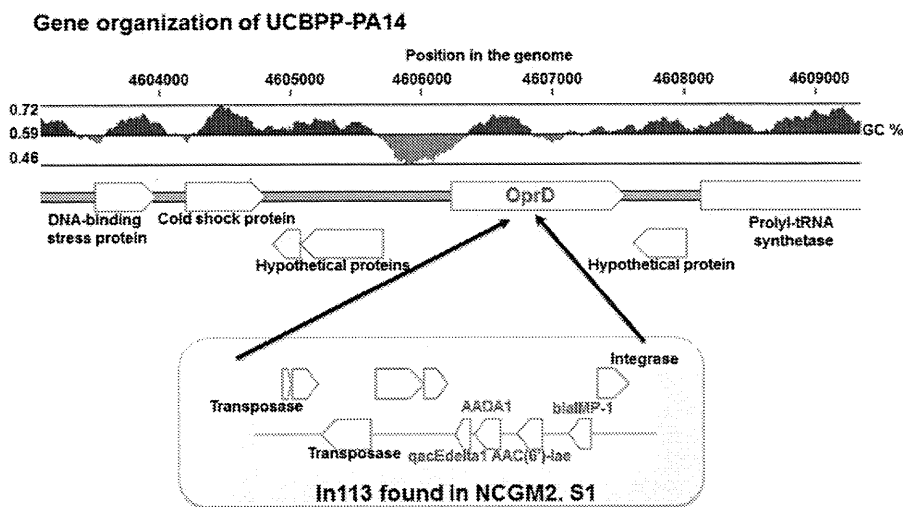


図3 NCGM2.S1株のインテグロン周辺の遺伝子環境

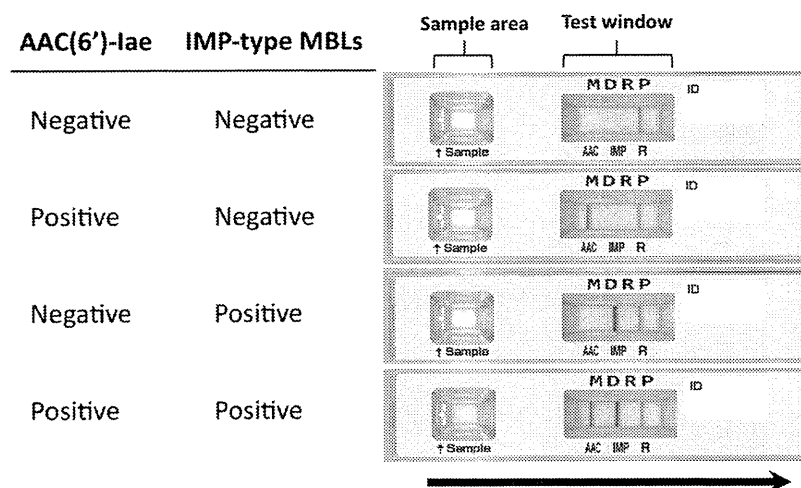


図4 IMP/AAC(6')-Iae 産生多剤耐性緑膿菌検出用イムノクロマトキット

研究分担者 佐多 徹太郎 (富山県衛生研究所)

研究要旨

薬剤耐性菌(以下、「耐性菌」)を医療関連施設等において迅速に把握し、健康被害の拡大を防止することは現在の医療のかかえる重要な課題である。その防止のために地方衛生研究所(以下、「地研」)の細菌学的検査、解析能力は有用である。本研究では、既知の耐性菌の検査に対応した検査法の導入のための精度管理、耐性菌の検査に対応した新たな解析法の開発と地研の特性を活かした研究を実施した。その結果、①感染症マニュアルに示されているメタロβ-ラクタマーゼ産生菌の検査法の精度管理を実施し、再現性の高い検査であることを示す一方で、本検査の注意点を指摘した。さらに、②新しい分子疫学的検査法である LinePCR 法を開発、及び③地研の特性である地方の医療機関との連携から生じた多剤耐性菌の解析と公衆衛生上問題となりつつある基質拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)の分布や起源に関する研究を実施した。このような成果は、医療関連分野だけでなく、広く公衆衛生分野で貢献する成果となる。今後、このような情報を地研間で共有することにより、地域で発生する耐性菌による健康被害に迅速に対応する検査能力の向上に繋がると期待される。

研究協力者

綿引 正則 (富山県衛生研究所)
磯部 順子 (同上)
八柳 潤 (秋田県健康環境センター)
白木 豊 (岐阜県保健環境研究所)
鈴木 匡弘 (愛知県衛生研究所)
石畝 史 (福井県衛生環境研究センター)
小黑 祐子 (福島県衛生研究所)
青木 敦子 (埼玉県衛生研究所)
砂押 克彦 (同上)
村上 光一 (福岡県衛生研究所)
緒方喜久代 (大分県衛生環境研究センター)

今年度は、1) 日本で検出されるメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)産生菌の検査の精度管理を実施する。地研の検査担当者で、それぞれの異なる環境において、国立感染症研究所病原体検出マニュアル掲載プライマーの評価することを目的とする。さらに、2) 近年発生している新しい耐性菌の検査に対応した新たな解析法の開発(昨年度から継続) 3) 一医療機関から長期にわたり分離されたIMP型 MBL 産生アクロモバクターの分子疫学的解析とそのインテグロンの解析、4) CTX-M型基質拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)保有株の分布状況、5) CTX-M型 ESBL の起源に関する研究を実施した。これらは、自ら解析能力の向上を図る研究という位置づけで実施された。
(上記、3,4,5の成果については、別報告書を参照)

A. 研究目的

耐性菌による医療関連感染症などの発生を早期に把握し、健康被害の拡大を防止するために、地研の検査解析能力をどのように有効利用するか、具体的に検討し提言することが本研究の目的である。

そのために、1) 検査技術強化のために研修会を開催し、地研担当者と議論し、耐性菌の解析機能強化について支援すること、2) 近年発生している新しい耐性菌の検査に対応した新たな解析法の開発を行い、その過程で自ら耐性菌の解析能力の向上を図り、医療関連分野だけでなく、広く公衆衛生分野で貢献することを目指す。

B. 研究方法

1. MBL 遺伝子検査の精度管理と IMP-1 プライマーの評価

1-1. 方法

精度管理の方法は、国立感染症研究所病原体検出マニュアルの方法に準拠して実施した。参加機関は、本研究班の9地研とし、使用する試薬等については、サーマルサイクラー以外は、基本的に統一するため、プライマー合成、アガロース等一括購入し、配布した。使用酵素は、配布した ExTaq (タカラバイオ) を使用する共通法と実施機関で通常利用している PCR 系で実施した。

精度管理に使用した菌株は秋田県健康環境センターで分離された緑膿菌 5 株 (臨床分離株) で、以下、菌株番号と保有する MBL 型を示す。

- Mβ-180 (VIM-2)
- Mβ-192 (IMP-1)
- Mβ-213 (IMP-1)
- Mβ-221 (VIM-2)
- Mβ-224 (IMP-1)

これに加えて、IMP-2 遺伝子を保有する緑膿菌から抽出した IMP-2 DNA (富山県衛生研究所で準備) を配布して、精度管理の際の鋳型とした。

プライマーは、感染症マニュアルに記載されているプライマーを使用した。配列と増幅サイズは表 1 に示した。

1-2. IMP-1 プライマーの評価

国立感染症研究所病原体検出マニュアルに記載されている IMP-1 プライマーの評価のために、使用した菌株は、愛知県衛生研究所保有の 183 株のカルバペネム耐性 *Pseudomonas aeruginosa* (国立国際医療研究センターより提供された 180 株および愛知県衛生研究所保存株) のうち PFGE パターンに多様性を持たせ選択した 24 株、並びに *P. putida* 1 株及び *Klebsiella oxytoca* 1 株を使用し (表 2)、病原体マニュアル掲載 IMP-1 用プライマー (表 1) で増幅した後、塩基配列決定を行った。

2. 薬剤耐性菌の検査法開発 (LinePCR)

2-1. 供試菌

臨床分離株である MBL 産生性緑膿菌 20 株 (Pa1~20) を用いた (表 3)。

2-2. PCR

トリプチケースソイ寒天培地で生育した新鮮コロニーの一部を 100μL 5%(W/V)キレックス 100 に懸濁し、100°C 10 分間処理を行い、遠心した後、その上清を PCR の鋳型とした。また、この上清の一部は、UV (260nm) 吸収を測定した。PCR には、KODFX (Toyobo) を用い、以下の反応系をセットした。

鋳型 DNA	200ng
dNTP (final)	0.4mM
Primers (each)	0.1μM
(添付反応緩衝液)	
<u>KODFX</u>	<u>1 unit</u>
Volume	50μL

また、反応サイクルは、

- (94°C2 分, 74°C5 分) 5 サイクル
- (94°C2 分, 72°C5 分) 5 サイクル
- (94°C2 分, 70°C5 分) 5 サイクル

(94°C2 分, 68°C5 分) 20 サイクル とした。

(倫理面への配慮)

本研究では患者情報を切り離した臨床分離株のみを取り扱っているため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

1. MBL 遺伝子検査の精度管理と IMP-1 プライマーの評価

1-1. MBL 遺伝子検査の精度管理

今回の精度管理に使用された機関のサーマルサイクラーと及び機関数は以下の通りである。

装置名	機関数
ABI PCR9700	4
Takara Thermal Cycler M	1
Takara Dice TP-650	1
Bio-Rad I Cycler	1
Bio-Rad Tetrad 2	1
アステック ジーンアトラス	1

配布された 5 種の緑膿菌の熱抽出 DNA を鋳型とし、配布された IMP-2 DNA を鋳型として加え、共通法で PCR を実施した。その結果は図 1 に示した。

また、9 機関のうち 7 機関で通常使用している PCR 系 (試薬あるいはキットなど) を用いて、同様に実施した。今回使用された試薬は、ExTaq (Takara)、GoTaqHS,2x Master (Promega)、TopTaq (Qiagen)、AmpliTaq Gold (Roche)、Taq DNA polymerase (Greiner) で、結果は図 2 に示した。

その結果、共通法、及び機関で通常使用している PCR 試薬を用いた方法においても、再現性の高い結果を得た。

1-2. IMP-1 プライマーの評価

IMP-1 プライマーを用いて増幅した供試菌 26 から得られた PCR 産物の塩基配列を決定した。26 株のうち 21 株は IMP-1 like MBL を保有していた。また、3 株の *P. aeruginosa* は imp-11 like MBL、2 株の *P. aeruginosa* は imp-7 like MBL を保有していた (表 2)。また、その塩基配列産物の系統関係は図 3 に示した。

2. 薬剤耐性菌の検査法開発 (LinePCR)

2-1. LinePCR 用のプライマーの設計

緑膿菌の分子疫学的マーカーとして LinePCR を用いる場合の標的機能遺伝子として、薬剤耐性に関連する遺伝子が集積したインテグロン及び薬剤の排出に関わる RND (resistance, nodulation, division) を選んだ (図 5)。この RND は、緑膿菌染色体上に複数存在することが知られており、ここでは RND I, II, III を選択した。この領域について、DDBJ から緑膿菌ゲノム配列を入手し、プライマーを設計した。

2-2. マルチローカス LinePCR

LinePCR は、機能遺伝子領域に数ヶ所のアニーリングする部位の配列の持った完全な相補的配列としたオリゴヌクレオチドをプライマーとして利用して、1~1.5%アガロースゲル電気泳動を用い、得られたその増幅多型を多型マーカーとして用いる、多型を検出する技術である。これまでの解析から、約 5k 塩基対の遺伝子領域の遺伝子の有無と、その電気泳動像を比較することで、株間のその遺伝子領域の構造の違いを類推することができる (図 4)。この詳細な開発の経緯については、昨年度までの本研究班で報告してきた。耐性菌において、薬剤耐性遺伝子の集積したインテグロンを機能遺伝子単位として、これをターゲットとした LinePCR の結果と供試菌の PFGE 解析結果を比較しても、本法が疫学的な解析手法としての可能性を示唆していたが、どの程度利用できるか明らかにできていなかった (図 5)。今年度は、本技術の応用研究として、マルチローカス LinePCR の開発を行い、分子疫学的解析法のひとつである PFGE 法との比較を実施した。即ち耐性菌の解析あるいはこの多型を分子疫学的なマーカーとする場合には、解析したいゲノム上に数ヶ所に点在する機能的な遺伝子単位 (例えば、オペロン単位) を選択し、その多型を比較することによって、PFGE などの現在利用されている方法と比較できる分子疫学的手法になると考えられる (マルチローカス LinePCR)。

マルチローカス LinePCR の評価の対象とした株は、疫学情報 (分離年および分離施設) と PFGE パターンを勘案して、Pa13, 16~20 を選別した (PFGE パターンは、図 5. △; 図 7. A)。

また、今回の検討に使用した LinePCR 用のプライマーの配列と組み合わせ (以下、Primer Mix) は、図 6 に示した。今回は、プライマーの組み合わせによる多型データとの関連を見るために、8 種類の Primer Mix を作成した。integron を検出するための 2 種類の Primer Mix、RND 検出のために 6 種類の Primer Mix を準備した。これらの Mix は、

プライマー 8 本から、最大 20 本のプライマーの混合物からなり、今回のマルチローカス LinePCR のターゲット領域は、integron, RND I~III の 4 か所である。

8 種類の Primer Mix を用いた解析結果は、図 7.B に示した。その結果は、以下の通りであった。

- ①Primer Mix Int#5 を用いた PCR では、Pa13,16,19,20 と Pa17,18 で 2 つの多型が観察された。
- ②Primer Mix Int#7 を用いた PCR では、Pa13,16,19, Pa17,18 及び Pa20 で 3 つの多型が観察された。
- ③Primer Mix RND I#1 では、Pa13 と Pa16~20 で 2 つの多型が観察された。
- ④Primer Mix RND II#2 では、Pa13 と Pa16~20 で 2 つの多型が観察された。
- ⑤Primer Mix RND II#3 では、Pa13 と Pa16~20 で 2 つの多型が観察された。
- ⑥Primer Mix RND III#4 では、Pa13, Pa16~19 と Pa20 で 3 つの多型が観察された。
- ⑦Primer Mix RND III#5 では、Pa13, Pa16~19 と Pa20 で 3 つの多型が観察された。
- ⑧Primer Mix RND III#6 では、Pa13, Pa16~20 で 2 つの多型が観察された。

D. 考察

1. MBL 遺伝子検査の精度管理と IMP-1 プライマーの評価

1-1. MBL 遺伝子検査の精度管理

この精度管理の第一の目的は、参加した地研 9 機関において、共通の試薬と PCR のサイクル条件の下、異なるサーマルサイクラーを使用した時の検査結果の再現性を評価することである。その結果、今回使用した MBL 遺伝子を検出するプライマーは、

- ①PCR のサーマルサイクラーの違い
- ②PCR 用試薬、あるいはキットの違い
- ③担当者の違い

に依存せず、再現性の高い結果が得られることが分かった。従って、本法による MBL 検査は、地研等における通常業務に適していると判断される。

1-2. IMP-1 プライマーの評価

日本で検出される IMP 型メタロ-β-ラクタマーゼには IMP-1, 2 のみならず IMP-7 および IMP-11 like なものも少なからず存在することが判明した。病原体マニュアル掲載の IMP-1 検出プライマーを用いて検出可能な場合が多いと考えられるが、プライマー領域の配列は一致しておらず、擬陰性となる可能性もあり、今後検討が必要である。

2. 薬剤耐性菌の検査法開発 (LinePCR)

今年度は、LinePCRによる多型解析を株間の異同を比較する分子疫学的なマーカーとして利用の可能性を評価した。しかし、5kb程度の塩基配列上の多型を検出しても、株全体の多型は代表しえないので、ゲノム全体をカバーするために、いくつかの機能遺伝子単位を同時に数ヶ所検査することで、達成できる可能性を検討した。ターゲットは、integronについて、染色体やプラスミド上に存在することが知られているので、その多型を分子疫学的マーカーとしての有用性を昨年までの研究で示されていた。しかし、医療機関内の薬剤耐性菌の集団発生が起こった場合の検査として、PFGEのような株間の比較はできないので、LinePCRのターゲットとして、染色体上の機能遺伝子領域をさらに選定する必要があった。緑膿菌の場合、多剤耐性に薬剤排出ポンプとして知られるRND等が関与していることが報告されていることと、この領域は遺伝子オペロンとしての特徴と、環境適応という観点から、多型の存在の可能性等、ターゲットの要件を満たしていると考えた。そこで、このRNDのターゲットの多型検出のためのプライマーの組み合わせ等を勘案して、今回のマルチローカスLinePCRとしては、integron, RNDI, II及びIIIの4か所とした。

その結果、integronについては、Primer Mix Int#7を用いた場合、3多型が検出された。また、RNDについては、Primer Mix RND III#4とRND III#5を用いたときに3多型が検出された。今回、検討に供試した株であるPa13,16-20の疫学情報とともにこの結果をまとめたのが表4である。

この結果は、この6株のPFGEは、それぞれ完全には一致していない(図7. A)が、Pa16~19は、分離年と分離施設が同一であり(表4)、その遺伝的關係に興味を持たれていた。今回のマルチローカスLinePCRの結果について、Pa16と19、及びPa17と18が一致していた。今回のPa16~19のように、PFGEパターンの類似性は認められるものの、その遺伝的關係が明確でない場合、今回、開発したマルチローカスLinePCRは、分離菌の関係を検査する方法として有用であると期待される。今後は、より適切なプライマーの組み合わせを検討し、解像度の高い系として、改良して行きたい。

この方法は、多数のプライマーを使用する方法であるが、一度有効性が示されたPrimer Mixが決定されれば、PFGEと比べて、短時間で結果を判定することが可能になると思われる。また、増幅物の解析にアガロース電気泳動は必要であるが、1~1.5%アガロースゲルで実施可能である。

今後、PFGEに代わる遺伝子解析法となるためには、ターゲット領域の選定が重要になる。機能遺伝子領域等を適切に選ぶことにより、分子疫学マーカーとして、新しい応用も考えられるが、ゲノム配列が容易に入手可能であり、今回は緑膿菌で検討したが、他の細菌種にも応用が可能であると考えられる。

E. 結論

- ① MBL 遺伝子検査の精度管理により、現在、地研に配備されているPCRの試薬、装置で再現性のたかい、結果が得られることが確認された。しかし、新しい耐性菌が出現するなかで、MBL 遺伝子も様々なタイプが検出されており、今回使用したプライマーの結果について、注意すべき点が存在することも明らかになった。
- ②新しい分子疫学的解析法であるLinePCRを開発し、その有効性が示された。今後、さらに改良し、応用することが期待される。
- ③医療機関で分離された高度耐性菌の解析、耐性遺伝子の分布や起源に関する研究を実施した。

以上の研究は、地研の特性を活かした研究であり、これらの研究内容を地研の担当者間で共有することで、地研の耐性菌の検査、解析能力は向上すると考えられる。

今後は、地研のネットワークを利用した研究の推進、共有化が重要である。

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

- 1) Masanori Watahiki, Jun Yatsuyanagi, Junko Isobe, Yutaka Shiraki, Masahiro Suzuki, Fubito Ishiguro, Katsuhiko Sunaoshi, Koichi Murakami, Kikuyo Ogata, Takeshi Kurata, Yoshichica Arakawa, Nami Kanno, Atuko Aoki: Multilocus Line PCR: A Novel Epidemiological Tool Based on the Polymorphism of Functional Gene Clusters, International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress (第84回日本細菌学会総会共同開催), Sapporo, Japan, September 2011.
- 2) Jun Yatsuyanagi, Shioko Saitou, Masanori Watahiki, Yutaka Shiraki, Masahiro Suzuki,

Fubito Ishiguro, Nami Kanno, Katsuhiko Sunaoshi, Koichi Murakami, Kikuyo Ogata, Yoshichica Arakawa: Characterization of *Kluyvera cryocrescens* Strains Harboring a Novel Variant of blaCTX-M Gene Isolated from Retail Poultry in Akita, Japan, International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress (第 84 回日本細菌学会総会共同開催), Sapporo, Japan, September 2011.

- 3) Tamie Noda, Koichi Murakami, Yoshiki Etoh, Kazumi Horikawa, Masaru Usui, Tetsuo Asai, Jun Yatsuyanagi, Masanori Watahiki, Yoshichica Arakawa, Shuji Fujimoto::Remarkable Increase in Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporins in *Salmonella infantis* Isolated from Retail Foods, International Union of Microbiological

Societies (IUMS) 2011 Congress (第 84 回日本細菌学会総会共同開催), Sapporo, Japan, September 2011.

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

表 1. メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子検査の精度管理に使用したプライマー

対象遺伝子	プライマー	配列(5'→3')	増幅サイズ(bp)
IMP-1	IMP-1F	ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC	587
	IMP-1R	ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC	
IMP-2	IMP-2F	GTT TTA TGT GTA TGC TTC C	678
	IMP-2R	AGC CTG TTC CCA TGT AC	
VIM-2	VIM-2F	ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG	801
	VIM-2R	CTA CTC AAC GAC TGA GCG	

表 2. IMP-1 用プライマーを用いた PCR によって得られた増幅物の評価

	total	imp-1	imp-7	imp-11
<i>P. aeruginosa</i> ST235(CC235)	10	9	1	
<i>P. aeruginosa</i> ST357(CC357)	5	3	1	1
<i>P. aeruginosa</i> CC244	3	2		1
<i>P. aeruginosa</i> ST991slv	2	2		
<i>P. aeruginosa</i> NA	1			1
<i>P. aeruginosa</i> ST260	1	1		
<i>P. aeruginosa</i> ST360slv, ST864slv	1	1		
<i>P. aeruginosa</i> ST697	1	1		
<i>P. putida</i>	1	1		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1		
total	26	21 (81%)	2	3

表 3. 供試緑膿菌 (Pa)リスト

緑膿菌	分離施設 (分離年)	MBL型
Pa1	A (2004)	IMP-1
Pa2	B (2005)	IMP-1
Pa3	C (2006)	IMP-1
Pa4	D (2007)	VIM-1
Pa5	E (2004)	IMP-1
Pa6	F (2004)	IMP-1
Pa7	G (2004)	IMP-1
Pa8	H (2004)	IMP-1
Pa9	I (2004)	IMP-1
Pa10	J (2005)	IMP-1
Pa11	K (2006)	IMP-1
Pa12	L (2004)	IMP-2
Pa13	M(2004)	VIM-2
Pa14	N(2005)	VIM-2
Pa15	O (2005)	IMP-1
Pa16	P (2008)	VIM-2
Pa17	P (2008)	VIM-2
Pa18	P (2008)	VIM-2
Pa19	P (2008)	VIM-2
Pa20	Q (2007)	VIM-2

表 4. 緑膿菌 6 株の疫学的背景とマルチローカス LinePCR

<i>Pu</i> No.	13	16	17	18	19	20
Year	'04	'08	'08	'08	'08	'07
MBL	←----- VIM-2 ----->					
Hospital	M	P	P	P	P	Q
Int-mix#5	○	○	●	●	○	○
Int-mix#7	○	○	●	●	○	△
RND I #1	×	●	●	●	●	●
RND II #2	○	●	●	●	●	●
RND II #3	○	●	●	●	●	●
RND III #4	×	●	●	●	●	△
RND III #5	×	●	●	●	●	△
RND III #6	×	●	●	●	●	●