

阻害することが示された。一方、POAにも弱い阻害活性が認められた。また、pH6.2の条件下ではPZAとPOAのどちらもほとんど阻害活性を示さなかった。

考察

結核菌由来 QAPRTase の活性は PZA によって強く阻害された。PZA と QA の構造が類似していることなどから、PZA は QA 結合サイトに結合することによって本酵素の活性を阻害していると考えられる。今後は、本酵素と PZA の複合体の立体構造解析を行うことによって、詳細な PZA の結合様式を明らかにすることを予定している。本研究結果により、PZA を改良した新規抗結核薬の開発につながることを期待される。

結論

結核菌由来 QAPRTase の発現・精製を行い、酵素学的諸性質を決定した。

PZA が結核菌由来 QAPRTase の活性を中性条件下で強く阻害することを示した。

研究発表

学会発表

1. 森茂太郎、金玄、林原絵美子、荒川宜親、柴山恵吾. 結核菌由来ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼの機能解析. 第 86 回日本細菌学会総会 2013 年 3 月 千葉
2. 金玄、柴山恵吾、林原絵美子、森茂太郎. Expression, Purification and Characterization of Enzymatic activities of QAPRTase from *M. tuberculosis*. 第 86 回日本細菌学会総会 2013 年 3 月 千葉

薬剤耐性菌の分子疫学及び耐性機構に関する研究

(*Helicobacter cinaedi* の分子疫学と薬剤耐性)

研究分担者 柴山 恵吾 (国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
研究協力者 林原 絵美子 (国立感染症研究所・細菌第二部・研究員)

研究目的

Helicobacter cinaedi は動物や人の腸管に存在する *Helicobacter* 属菌の一つであり、人からの分離報告例が近年増加している。*H. cinaedi* が分離される患者は主に免疫不全患者であり、菌血症や腸炎の原因菌として血液や糞便から分離されることが多い。しかし、免疫が健常人からの蜂窩織炎の原因菌としての分離も報告されており、*H. cinaedi* がどのように人に感染しこのように様々な病態を示すのかは明らかになっていない。さらに近年、*H. cinaedi* による院内感染が疑われる事例も報告された。しかし、これまで *H. cinaedi* の分子疫学的解析は行われていない。そこで、本研究では *H. cinaedi* の分子疫学的解析法の確立を目的とし、Multilocus Sequence Typing (MLST) および Pulse field Gel Electrophoresis (PFGE) 法による解析を行った。さらに *H. cinaedi* の薬剤耐性分布についても報告がないことから薬剤感受性についても調査した。

研究方法

菌株は日本の7つの病院で人より分離された *H. cinaedi* 50 株を用いた。また、海外で分離された人由来株4株 (CCUG18818 株, CCUG18819 株, MIT 99-5915 株, CCUG43521) と動物由来株2株 (MIT 00-5434 株, MIT 00-5002 株) も解析に用いた。*H. cinaedi* CCUG18818 株のゲノム情報をもとに、MLST に用いる候補遺伝子として21個の housekeeping gene を選び、8 株についてシーケンスを比較した結果より、最終的に7 遺伝子を選び全株の解析に使用した。PFGE には制限酵素 *XhoI* または *SpeI* を用い、泳動パターンを MLST 解析の結果と比較した。薬剤感受性は5%馬血含有ミューラーヒントン寒天培地を用い、寒天平板希釈法により測定した。

研究結果・考察

MLST の候補遺伝子として調査した21 遺伝子は高い相同性を示した (96.5 – 100%)。そのうち、バリエーションが認められた7 遺伝子 (23S rRNA, *ppa*, *aspA*, *aroE*, *atpA*, *tkl*, *cdtB*) を MLST に使用し、解析した結果、対象とした菌株56 株は14 つの Sequence Type (ST)、8 つの Clonal Complex (CC) に分類された。院内感染が疑われた病院 A では分離された12 株のうち、11 株は

同一の CC9 に分類された。さらに、CC9 に分類された菌株は全て同一の PFGE パターンを示した。一方、時期をおいて散発的に *H. cinaedi* が分離された病院 D では 6 つの菌株が異なる 3 つの CC を示した。薬剤感受性を測定した結果、日本で分離された *H. cinaedi* はいずれもクラリスロマイシンおよびシプロフロキサシンの MIC が 16 mg/L 以上であった。そこでこれらの抗菌薬の標的である 23S rRNA および DNA Gyrase を調査した結果、日本の分離株は全て 23S rRNA および GyrA の薬剤標的部位に変異を持っていた。

結論

本研究で開発した *H. cinaedi* の MLST は、感染経路を明らかにするのに有用であると考えられた。また日本人からの *H. cinaedi* 株はクラリスロマイシンおよびシプロフロキサシン耐性株が非常に多いと考えられた。

研究発表

学会発表

1. 林原絵美子, 柴山恵吾. *Helicobacter cinaedi* の分子疫学的解析と薬剤感受性. 第 18 回日本ヘリコバクター学会学術集会 2013 年 3 月 岡山
2. Emiko Rimbara, Shigetaro Mori, Mari Matsui, Satowa Suzuki, Jun-ichi Wachino, Yoshiaki Kawamura, Zeli Shen, James G. Fox, Keigo Shibayama. Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from 7 hospitals in Japan. XXVth International Workshop of the Helicobacter Study Group. Sep. 2013, Slovenia

論文発表

1. Rimbara E, Mori S, Matsui M, Suzuki S, Wachino J, Kawamura Y, Shen Z, Fox JG, Shibayama K. Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from seven hospitals in Japan. J Clin Microbiol. 2012 Aug;50(8):2553-60.

薬剤耐性菌の分子疫学及び耐性機構に関する研究
(薬剤耐性菌における同種異種間の相互作用)

研究分担者	柴山 恵吾	(国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
研究協力者	鈴木 仁人	(国立感染症研究所・細菌第二部・研究員)
研究協力者	松井 真理	(国立感染症研究所・細菌第二部・研究員)
研究協力者	鈴木 里和	(国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官)

アシネトバクター・バウマニ (*Acinetobacter baumannii*) は弱毒性のグラム陰性細菌で、2000年代から広範な抗菌薬に耐性を獲得した多剤耐性株が臨床検体から分離されるようになり、院内感染の起因菌として重大な関心事となっている。近年、世界の医療機関において多剤耐性アシネトバクターによる院内感染アウトブレイクが頻発しており、本邦の医療機関においても継続的に報告されてきている。本菌のハウスキーピング遺伝子配列を用いた MLST (multilocus sequence typing) による分子疫学的解析により、世界で急速に広がった多剤耐性株は、仏パスツール研究所の MLST 分類において主に ST2 (sequence type 2) 型に分類可能であり、日和見感染症ながら同流行株はパンデミックを引き起こしていることが明らかとなっている。

2000年代に日本を含む世界の医療機関で分離されたアシネトバクター・バウマニのうち、MLST や PFGE (pulse-field gel electrophoresis) などによる分子疫学的解析や抗菌薬感受性解析が為されている臨床分離株を選び、ゲノム配列の解析を行った。その結果、RTX 毒素や VI 型分泌機構 (T6SS: type VI secretion system) 関連タンパク質など、流行株に特異的に保存されている遺伝子を約 50 個同定した。T6SS は病原細菌に広く保存されているタンパク質分泌機構で、T6SS 陽性の細菌は隣接する細菌に T6SS を介してエフェクタータンパク質を注入することが知られている。近年、緑膿菌やセラチア属細菌は、ムラミダーゼ構造またはアミダーゼ構造を持つ抗菌エフェクターを隣接細菌のペリプラズムに注入し、細胞壁を構成するペプチドグリカンを破壊することで殺菌することが報告された。また、T6SS 陽性の細菌は自己もしくは同種細菌間で殺されないような自己免疫機構を進化させており、抗菌エフェクターと結合し、抗菌活性を阻害可能な免疫タンパク質を有することも報告されている。

本研究では薬剤耐性菌の流行性と T6SS 活性の相関に関して詳細な検討を行う目的で、多剤耐性の流行株と薬剤感性の非流行株を含むアシネトバクター・バウマニ臨床分離株の大腸菌に対する殺菌活性を測定した。その結果、アシネトバクター・バウマニは流行株の中にのみ大腸菌に対する殺菌活性が強い株が存

在することを見出した。流行株の T6SS 欠損株を用いた解析から、流行株の大腸菌に対する殺菌活性は T6SS の働きに依存していることが明らかとなった。更に、アシネトバクター・バウマニ同種間の競合実験から、流行株は非流行株を殺せるが、流行株同士は競合し合わないことが明らかとなった。即ち、近年の急速な多剤耐性株の世界的拡散には T6SS の役割が重要であったことが示唆された。また興味深いことに、アシネトバクターの流行株と緑膿菌や肺炎桿菌など他種の院内感染菌流行株との競合実験から、これらの菌は互いに顕著には競合せず、T6SS 免疫システムは種を超えて共有されていることが示唆された。

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 (新型メタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の構造と機能に関する研究)

研究分担者 荒川 宜親 (名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学/耐性菌制御学・教授)
研究協力者 和知野 純一 (同上・助教)

研究要旨: 臨床分離カルバペネム耐性 *Serratia marcescens* より新たに発見した新規メタロ-β-ラクタマーゼ SMB-1 の X 線結晶構造解析を行い、その詳細な構造を決定した。SMB-1 の基本構造は他のサブクラス B3 メタロ-β-ラクタマーゼである L1 や BJP-1 と類似していた。しかし、β-ラクタム薬に対する加水分解活性は3者で大きく異なるため、さらに個々のアミノ酸レベルで詳細な比較を行った。その結果、SMB-1 においては 157 番目のグルタミンの存在が基質認識に重要であるものと予測された。本アミノ酸は SMB-1 のみに存在し、L1 や BJP-1 には存在しない。そこで、アラニン変異体を作成し、酵素活性を測定したところ、各種 β-ラクタム薬に対する触媒効率(k_{cat}/K_m)が大きく低下した。したがって、157 番目のグルタミンは SMB-1 において、その高い酵素活性の発揮に重要な部位であることがわかった。さらに我々は、メタロ-β-ラクタマーゼの阻害剤であるメルカプト酢酸との共結晶を作製し、その活性部位における、メルカプト酢酸との配位構造を決定した。メルカプト酢酸のチオール基は2つの亜鉛原子(Zn1 と Zn2)に配位していた。また、1つの酸素原子が Zn2 と結合しており、メルカプト酢酸は Zn2 との間にキレート環を形成していることが判明した。

A. 研究目的

近年、医療現場において、NDM-1 などのカルバペネマーゼを産生する多剤耐性菌の広がりが増加している。このような状況を鑑み、前研究班 (H21-新興-一般-008) では、国内の医療機関から菌株を収集、調査を行い、我が国における多剤耐性菌の実状を明らかにした。その過程で、SMB-1 と命名した新型のカルバペネマーゼを産生する多剤耐性菌の存在をあきらかにした。本研究では、SMB-1 の立体構造を決定し、その構造から、本酵素が、高い酵素活性を示す分子機構を解明するとともに新たなカルバペネマーゼ阻害物質を創製することを目標としている。新たな阻害剤の創製は、多剤耐性菌の新たな治療法確立に役立つものと考えられる。

B. 研究方法

SMB-1 酵素の精製: SMB-1 遺伝子を pET30a 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。陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて精製を行った。

結晶作製: 結晶化条件のスクリーニングには市販のキットを用いた。結晶が出現した条件をさらに最適化し、X 線結晶構造解析に至適な結晶

を得た。さらに、メルカプト酢酸との共結晶をソーキングにより作製した。

回折データの回収: X 線結晶構造解析による回折データの回収は Photon Factory にて行った。

モデリング: SMB-1 の構造はメタロ-β-ラクタマーゼ L1 をサーチモデルに分子置換法にて決定した。解析プログラムは CCP4 の REFMAC5 を用いて精密化し、グラフィックプログラム Coot でモデルの修正を行った。

変異体の作製: 部位特異的変異導入法により、SMB-1 の 157 番目のグルタミンをアラニンに置換した。

酵素学的パラメータの算出: 各種 β-ラクタム薬を基質とし、酵素反応速度論解析を行った。

倫理面への配慮

患者診療情報やヒト臨床材料等を用いないため該当せず。

C. 研究結果と考察

リザーバー溶液として (A) 0.2M ammonium sulfate, 0.1 M sodium acetate, pH5.3, 28% PEG 2000 MME, および (B) 1M lithium chloride, 0.1M MES, pH5.8, 26% PEG 6000 を用いることで X 線結晶構造解析に至適な結晶を得

ることができた。条件 A にて得られた結晶を用いて、SMB-1 の構造を決定した。表1に回折データと精密化で得られたデータをまとめた。最終的に構造が決定できたのは、R37[3]から K309[261]で、N 末端の2アミノ酸と C 末端の1アミノ酸の電子密度は確認できなかった。SMB-1 の全体構造は $\alpha\beta/\beta\alpha$ のサンドイッチ構造をとっており、対面する2つの β シートの上部に浅い活性ポケットを形成していた(図1)。SMB-1 の全体像は他のサブクラス B3 メタロ- β -ラクタマーゼである AIM-1, BJP-1, L1, FEZ-1 と酷似していた(図1)。しかし、これら5つのサブクラス B3 メタロ- β -ラクタマーゼの N 末端の構造は大きく異なっていた。 β -ラクタム薬に対する加水分解活性が低い BJP-1 の N 末端は、活性ポケットを塞ぐように位置し、その一方で、加水分解活性の高い AIM-1, L1 の N 末端は活性ポケットから遠方に位置し、さらに分子表面側に突出していた。また、SMB-1 の N 末端は、他のサブクラス B3 メタロ- β -ラクタマーゼより極端に短いため、BJP-1 の N 末端のように、活性ポケットを塞ぐような構造はとっていない(図2)。このような N 末端の構造の違いが、サブクラス B3 メタロ- β -ラクタマーゼの加水分解活性に一部関与しているものと推測された。

SMB-1 の活性中心には2つの亜鉛原子(Zn1 および Zn2)が存在し、Zn1 には3つのヒスチジン(H116, H118, H196)が、Zn2 には2つのヒスチジン(H121, H263)とアスパラギン酸(D120)が配位していた(図3)。Zn1 と Zn2 の間には水分子が確認され、この水分子が β -ラクタム薬のカルボニル炭素を求核攻撃するものと考えられた。2つの亜鉛原子と周囲のアミノ酸及び水分子の位置関係は表2に示すとおりである。

さらに、活性中心周りの2つのループ構造を比較したところ、SMB-1 及び AIM-1 の獲得性サブクラス B3 メタロ- β -ラクタマーゼにのみ存在するアミノ酸が存在した(図4)。それは 157 番目のグルタミンで、その側鎖は活性中心を向いていた。したがって、このグルタミンは SMB-1 及び AIM-1 において基質認識に重要な部位であると考えられた。本アミノ酸の役割を検討するために、アラニン置換体を作製し、変異体酵素(Q157A)の β -ラクタム薬加水分解活性を測定した。その結果、Q157A 変異体酵素の活性は、野生型酵素に比べて大きく減弱していた(表3)。しかし、酵素活性が完全に失われなかったため、Q157 は SMB-1 の酵素活性に影響する部位と考えられるが、必須ではないと結論づけられた。

また、本研究ではメタロ- β -ラクタマーゼ共通の阻害剤であるメルカプト酢酸と SMB-1 の共結晶を作製し、その構造を決定した。共結晶は、条件 B にて作製した結晶を、10mM メルカプト酢酸が溶

解したリザーバー溶液に 30 分浸潤することで得た。メルカプト酢酸のチオール基は2つの亜鉛原子に配位しており、また、酸素原子が Zn2 に配位していた(図5)。メルカプト酢酸は Zn2 に対し、キレート環を形成していた。メルカプト酢酸と SMB-1 の複合体構造においては、野生型酵素で確認された亜鉛原子間の水分子は観察されなかった。したがって、メルカプト酢酸の結合により、求核攻撃に必要な水分子が排除されることが、メルカプト酢酸が SMB-1 の酵素活性を阻害する一因であると考えられた。

D. 結論

新型メタロ- β -ラクタマーゼ SMB-1 の構造を決定し、157 番目のグルタミンは SMB-1 において、その高い酵素活性の発揮に重要な部位であることが判明した。本研究成果は、メタロ- β -ラクタマーゼの阻害剤開発等に応用が期待される。

E. 研究発表

1. 論文(雑誌)発表

1) Wachino J, Yamaguchi Y, Mori S, Yamagata Y, Arakawa Y, Shibayama K.

Structural insights into the subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- β -lactamase inhibitor mecaptoacetate.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2013, 57(1): 101-9.

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.

新型メタロ- β -ラクタマーゼ SMB-1 の構造機能解析.

第41回薬剤耐性菌研究会. 岐阜. 2012.

F. 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

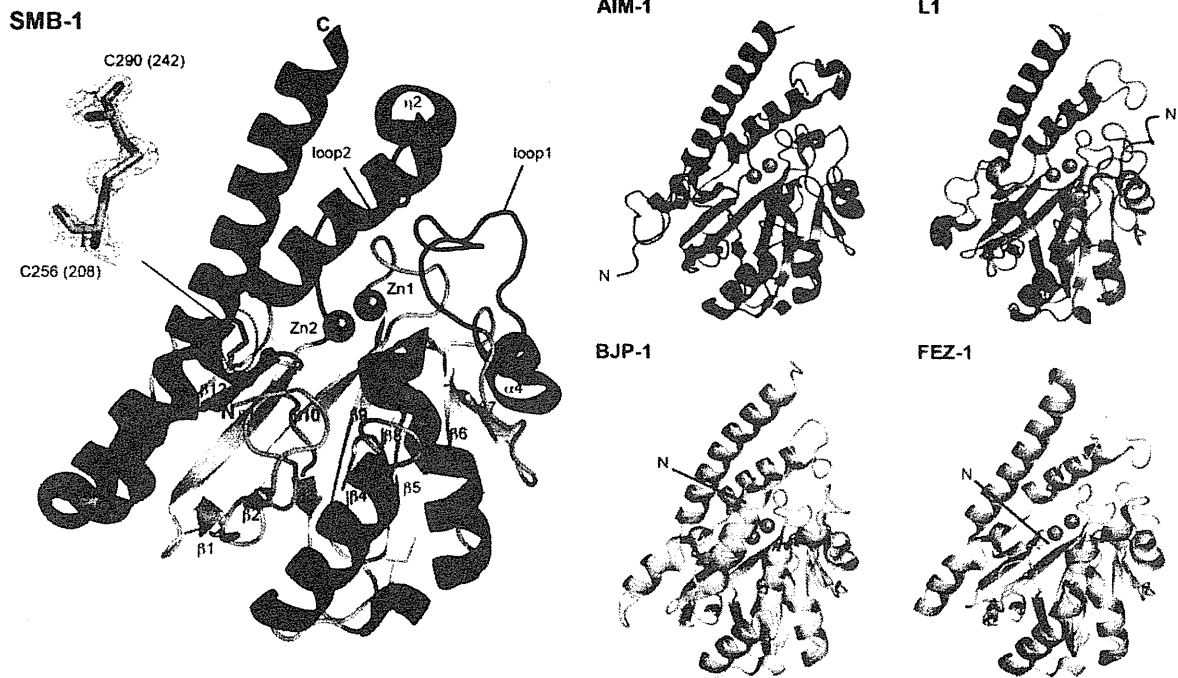


図1. SMB-1および他のサブクラスB3メタロ-β-ラクタマーゼの構造

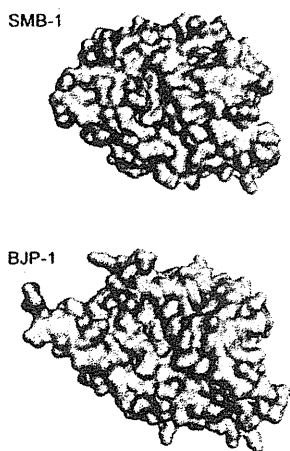


図2. SMB-1およびBJP-1の分子表面図

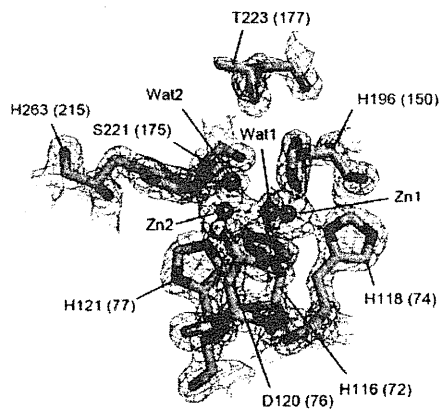


図3. SMB-1の活性中心

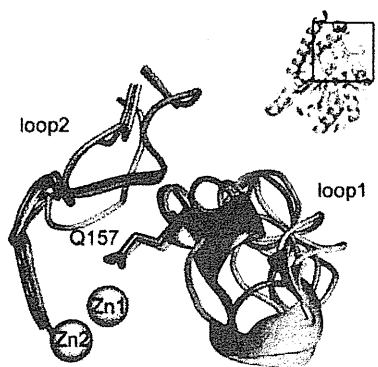


図4. 活性中心周囲のループ構造

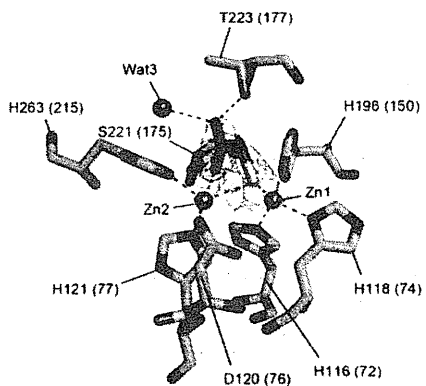


図5. SMB-1とメルカプト酢酸の結合の様子

表1

TABLE 1. Data collection and refinement statistics

	Native	Mercaptoacetate complex
Data collection		
Beam line	BL-5A (PF)	NW12A (PF-AR)
Wavelength (Å)	1.00	1.00
Resolution range (Å)	50.0–1.60 (1.63–1.60)	50.0–2.20 (2.24–2.20)
Space group	$P3_1$	$P3_1$
Cell dimensions		
<i>a</i> (Å)	67.83	67.03
<i>b</i> (Å)	67.83	67.03
<i>c</i> (Å)	48.67	46.79
No. of unique reflections	32909 (1654)	11951 (621)
Redundancy	11.2	11.3
Completeness (%)	99.4 (100.0)	100.0 (100.0)
R_{merge}^a (%)	5.1 (21.6)	9.7 (29.0)
mean $I/\sigma(I)$	73.4 (17.3)	48.2 (15.6)
V_M (Å ³ ·Da ⁻¹)	2.33	2.19
Solvent content (%)	47.3	43.8
Refinement		
Resolution (Å)	27.8–1.60 (1.64–1.60)	58.1–2.20 (2.26–2.20)
No. of reflections used	31222 (2313)	11367 (873)
R_{working} (%)	16.5 (21.0)	16.7 (16.4)
R_{free} (%)	20.0 (27.1)	22.4 (29.4)
No. of atoms		
Protein	1921	1907
Ligand/ion	53	9
Water	277	146
<i>B</i> -factors (Å ²)		
Protein	19.3	27.8
Ligand/ion	35.5	25.6
Water	31.3	29.6
r.m.s.d.		
Bond lengths (Å)	0.011	0.008
Bond angles (°)	1.43	1.18

^a $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the observed intensity for reflection for hkl , and $\langle I(hkl) \rangle$ is the average intensity calculated for reflection hkl from replicate data.

表2

TABLE 2. Zinc(II)-ligand distances (Å)

Zn atom	Atom or molecule	Native	Mercaptoacetate complex
Zn1	H116 [72] NE2	2.1	2.1
	H118 [74] ND1	2.1	2.0
	H196 [150] NE2	2.0	2.1
	O (Wat1)	2.0	
	O (Wat2)	3.1	
	O2 (MCR)		3.1
Zn2	S (MCR)		2.2
	D120 [76] OD2	2.1	2.1
	H121 [77] NE2	2.1	2.0
	H263 [215] NE2	2.1	2.0
	O (Wat1)	2.1	
	O (Wat2)	2.2	
Zn1	S (MCR)		2.4
	O2 (MCR)		2.6
Zn1	Zn2	3.5	3.6

表3

TABLE 3 Kinetic parameters^a and result of susceptibility testing

Substrate	β -lactamase	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Ampicillin	Wild	102	247	2.4×10^6	> 512
	Q157A	200	305	1.5×10^6	512
	Control	—	—	—	2
Ceftazidime	Wild	57	4.4	7.7×10^4	128
	Q157A	259	0.32	1.2×10^3	32
	Control	—	—	—	0.25
Cefotaxime	Wild	35	31	8.9×10^5	4
	Q157A	240	44	1.8×10^5	1
	Control	—	—	—	0.03
Cefepime	Wild	747	2.7	3.6×10^3	0.13
	Q157 A	428	0.28	6.5×10^2	0.06
	Control	—	—	—	0.015
Imipenem	Wild	133	518	3.9×10^6	4
	Q157 A	600	248	4.1×10^5	1
	Control	—	—	—	0.25
Meropenem	Wild	144	604	4.2×10^6	2
	Q157 A	102	167	1.6×10^6	0.5
	Control	—	—	—	0.03

^aStandard deviations of each parameter were below 20%.

Data for the wild-type enzyme are from the reference (47).

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

（OXA-48 を産生する新型耐性菌に関する研究）

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学／耐性菌制御学・教授）
研究協力者 長野 則之（名古屋大学大学院医学系研究科・客員研究員）
長野 由紀子（国立感染症研究所 細菌第二部・協力研究員）
外山 雅美（船橋市立医療センター）

研究要旨：OXA-48 カルバペネマーゼは 2001 年にトルコで分離された *Klebsiella pneumoniae* で初めて確認されて以降、欧州各国で急速に拡がり問題となってきた。本研究は、本邦で初めて確認された海外帰国者事例由来 OXA-48 産生菌の解析を目的とする。2012 年 11 月に東南アジアの国で治療歴を有する 60 代の男性患者について入院直後に採取の吸引痰より検出された *K. pneumoniae* (Kp1) と *Escherichia coli* (Ec)、その後監視培養で採取した鼠径部擦過物より検出された *K. pneumoniae* (Kp2) を対象に耐性因子等の解析を実施した。その結果 3 株は IMP、MEPM の MIC 値が 2 µg/ml で TAZ/PIPC に耐性であった。しかしながら Kp1 株は広域スペクトラムセファロスポリンに感性であるのに対し、Kp2 株、Ec 株は耐性で、且つ CAZ の MIC はクラブラン酸添加で低下し ESBL 産生性も示唆された。modified Hodge test で 3 株は陽性を示しカルバペネマーゼ産生性も示唆された。PCR 解析の結果 3 株は *bla*_{OXA-48} を保有しており、本遺伝子の周辺構造は Tn1999.2 であることが確認された。さらに Kp2 株と Ec 株はそれぞれ *bla*_{CTX-M-15} と *bla*_{CTX-M-55} を保有していた。3 株はおおよそ 70 kbp の接合伝達性プラスミドを共有していた。MLST 解析の結果、Kp1 株、Kp2 株、Ec 株はそれぞれ ST45、ST20、ST354 と同定された。本報の OXA-48 産生株ではカルバペネム系薬の MIC が低値で且つ Kp1 株では広域スペクトラムセファロスポリンに感性であったため日常的な検査では検出が困難と考えられるが、erutapenem を指標薬に用いた modified Hodge test が有用であった。海外からの新型耐性菌の流入を引き続き監視し、早期検出と適切な感染制御の実施によりそれらの国内での蔓延を防止する必要がある。

A. 研究目的

OXA 型カルバペネマーゼについては多剤耐性アシネトバクターが産生する OXA-23 型や OXA-51 型などがよく知られている。これに対して新型の OXA-48 型カルバペネマーゼには OXA-48 及びその variants である OXA-181、OXA-162、OXA-163、OXA-204 などがある。これらの OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌は *Klebsiella pneumoniae* で主に検出され死亡率も高いことなどから、医療関係者の間で警戒されている。プロトタイプの OXA-48 カルバペネマーゼは 2001 年にトルコで分離された *K. pneumoniae* で初めて確認されて以降、欧州各国で急速に拡がり問題となってきた。最近では米国、カナダからも報告されている。しかし

ながらこれまでに国内では検出されていなかった。本研究は本邦で初めて確認された海外帰国者事例由来 OXA-48 産生菌の解析を目的とする。

B. 研究方法

2012 年 11 月に東南アジアの国で 5 日間の脳梗塞の治療歴を有する 60 代男性患者が帰国後直ちに千葉県内の医療機関に入院した。入院直後に採取の吸引痰より検出された *K. pneumoniae* (Kp1) と *Escherichia coli* (Ec)、その後監視培養で採取した鼠径部擦過物より検出された *K. pneumoniae* (Kp2) を対象に耐性因子等の解析を実施した。MIC 測定は CLSI の微量液体希釈法により行った。カルバペネマーゼの検

出には CLSI の推奨する modified Hodge test を用いた。また、ESBL 産生性の確認は double-disk synergy test (DDST) により行った。耐性決定因子 *bla*_{OXA-48} group、*bla*_{CTX-M-1} group、*bla*_{TEM} group の PCR 検出、さらに構造遺伝子の塩基配列解析を行った。OXA-48 遺伝子については周辺領域の解析も実施した。Kp1、Kp2、Ec の MLST 解析を行った。

倫理面への配慮

本研究の内容を論文等で公表するにあたり、事前に患者及びその家族からインフォームドコンセントを取得している。

C. 研究結果

Kp1、Kp2、Ec の 3 株に対する imipenem (IPM) と meropenem (MEPM) の MIC 値はともに 2 µg/ml と軽度上昇しておりカルバペネマーゼ産生性が疑われた。また tazobactam/piperacillin (TAZ/PIPC) にも耐性 (MIC, >64 µg/ml) であった。Kp1 株の場合セフェム、モノバクタム系薬は感性であった。一方 Kp2 株と Ec 株とではセフェム、モノバクタム系薬は耐性で CAZ の MIC はクラブラン酸添加により低下したため ESBL 産生性が疑われた。さらに Ec 株ではアミノグリコシド、フルオロキノロン系薬なども耐性で、多剤耐性を獲得していた (Table 1)。

エルタペネムディスクを用いた modified Hodge test では Kp1、Kp2、Ec の 3 株共に陽性でカルバペネマーゼ産生性が強く疑われた (Fig. 1A)。さらに DDST では Kp2 と Ec の 2 株で CAZ、cefotaxime (CTX) に不定型な増殖阻止帯の拡張が観察され、これらの株の ESBL 産生性と CAZ、CTX の分解能の低いカルバペネマーゼ産生性が示唆された (Fig. 1B, 1C)。その他の sodium mercaptoacetate (SMA)、EDTA、及び 3-aminophenylboronic acid (APB) を用いた酵素阻害試験では 3 株共に陰性で、クラス A、クラス B カルバペネマーゼの存在は否定された。

PCR 検索により 3 株で OXA-48 型カルバペネマーゼ、加えて Kp2 株と Ec 株で CTX-M-1 型遺伝子が検出された。なお、KPC 型、IMP-1 型、IMP-2 型、VIM-2 型、NDM 型遺伝子は検出されなかった。構造遺伝子全長の塩基配列解析の結果、Kp1 株では OXA-48、Kp2 株では OXA-48 及び CTX-M-15、Ec 株では OXA-48 及び CTX-M-15 の variant である CTX-M-55 (A80V) と同定された (Table 1)。

OXA-48 遺伝子の周辺領域の解析では本遺伝子は二つのコピーの IS1999 から成る Tn1999 上に位置していた。さらに上流の IS1999 には ISIR の挿入が確認されたことから本遺伝子の周辺構造は既報の Tn1999.2 であることが確認され

た (Fig. 1D)。

Kp1、Kp2、Ec の 3 株はいずれも接合伝達可能なおよそ 70kbp のプラスミドを保有していた。

MLST 解析の結果 Kp1 株が ST45、Kp2 株が ST20、Ec 株が ST354 と判定された (Table 1)。

D. 考察

OXA-48 型カルバペネマーゼ産生菌はカルバペネム系薬の MIC 値が低値の場合も多く、時に CLSI や EUCAST の新ブレイクポイントを用いても感性と判定される場合があることから、一般の検査室における日常検査業務の中ではこの種の耐性菌の検出が非常に困難となっている。しかしながら OXA-48 カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* による感染症では高い死亡率が報告されており、例えばオランダのロッテルダム地域における最大規模のアウトブレイクでは 98 名中 27 名 (28%)、フランスやトルコのイスタンブールにおけるアウトブレイクではそれぞれ 7 名中 5 名 (70%) と 16 名中 9 名 (56%) に達していることから本菌を早期に検出し適切な治療を開始することは臨床的に非常に重要である。

OXA-48 カルバペネマーゼ産生菌は高頻度に CTX-M-15 を同時産生することが報告されているが、本研究の Kp1 株と Ec 株はそれぞれ CTX-M-15 と CTX-M-55 を産生していた。この CTX-M-55 は CTX-M-15 の variant で CAZ の分解性を高めていることが報告されている。このことから今回分離された Kp1 株と Ec 株でも OXA-48 型カルバペネマーゼ単独では分解し難い CAZ や CTX にも耐性を示していたが、OXA-48 遺伝子のみ保有の Kp1 では多くの報告にあるように広域スペクトラムのセファロスポリンに感性を示した。これら 3 株は TAZ/PIPC 耐性を示していたが、接合伝達により得られたトランスコンジュガントは ESBL 非産生性で TAZ/PIPC 耐性であった。またいずれも modified Hodge test 陽性であった。このことから広域スペクトラムのセファロスポリンが感性であった場合でも、modified Hodge test に加えて TAZ/PIPC 耐性が OXA-48 カルバペネマーゼ産生性のスクリーニングに有用であると考えられた。

Kp1、Kp2、Ec の OXA-48 遺伝子の周辺構造は Tn1999.2 と確認されたが、この Tn1999.2 は 2007 年トルコのアウトブレイク株に認められたものである。2001 年に初めてトルコで確認された OXA-48 遺伝子の周辺構造の Tn1999 とは異なり、上流の IS1999 に ISIR が挿入されており、これによって OXA-48 遺伝子発現の strong promoter を供与する可能性が示唆されている。

Kp1, Kp2, Ec の3株はそれぞれ ST45、ST20、ST354 と同定されたがこれらの sequence type は CTX-M-15 などの ESBL 産生株や KPC-2 カルバペネマーゼ産生株で多く認められているもので、先に報告されているアウトブレイクに関わる OXA-48 型カルバペネマーゼ産生株のタイプとは異なっていた。

世界的蔓延が懸念される腸内細菌科の菌種、特に *K. pneumoniae* が産生する新型カルバペネマーゼとして NDM-1、KPC-2 が、これまでに国内でも確認されている。今回新たに OXA-48 カルバペネマーゼ産生性の *K. pneumoniae* と *E. coli* が確認されたことから、この種の未だ稀な新型耐性菌の院内や地域あるいは国内への侵入、伝播拡散を防止する為に早期検出や、そのために有効な検出法の確立が急務であると思われる。加えて OXA-48 の variant である OXA-181 が既にインド国内で拡散していること、またインド隣国のバングラディッシュの病院で治療を受けシンガポールに移送された2名の患者から OXA-181 産生菌が検出されていることからアジア諸国をカバーする広範囲なサーベイランスが必要と考えられる。

E. 結論

OXA-48 カルバペネマーゼ産生菌については Kp2 株や Ec 株のように CTX-M 型 ESBL を共産性することで広域スペクトラムのセファロスポリンにも広範囲耐性の場合や、Kp1 株のように広域スペクトラムのセファロスポリンに感性的場合もあるが、modified Hodge test に加えて TAZ/PIPC 耐性が OXA-48 カルバペネマーゼ産生性のスクリーニングにおける着眼点として有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

2012 年 11 月にアジア地域で治療を受けて帰国した患者より、欧州で蔓延し大きな問題となっている OXA-48 型カルバペネマーゼを産生する肺炎桿菌などが国内ではじめて発見された。この種の耐性菌は多くの抗菌薬に多剤耐性を示す事から、早期検出とともに、実効ある感染制御の徹底に国内での蔓延を防止する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nagano, N., Y. Endoh, Y. Nagano, M. Toyama, M. Matsui, K. Shibayama, and Y. Arakawa. First report of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan from a patient returned from Southeast Asia. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66:79-81, 2013

・海外帰国患者より新型カルバペネマーゼ (OXA-48 型) 産生肺炎桿菌等の分離 (厚生労働省 病原微生物検出情報, IASR Vol. 33 p. 336-337: 2012 年 12 月号)

2. 学会発表

・第 87 回日本感染症学会学術講演会 / 第 61 回日本化学療法学会総会 合同学会で発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきもの無し

Table 1 MICs of antimicrobial drugs for OXA-48-producing *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates in a patient, Japan

Antimicrobial drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for		
	<i>K. pneumoniae</i> 1	<i>K. pneumoniae</i> 2	<i>E. coli</i>
	ST45	ST20	ST354
	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{CTX-M-55} <i>bla</i> _{TEM-1b}
Ampicillin	>16	>16	>16
Amoxicillin/clavulanate	>16	>16	>16
Piperacillin	>64	>64	>64
Piperacillin/tazobactam	>64	>64	>64
Cefazolin	≤ 4	>16	>16
Cefaclor	>16	>16	>16
Cefotiam	≤ 8	>16	>16
Cefotaxime	1	>128	>128
Cefotaxime/clavulanate	0.25/4	>32/4	>32/4
Ceftazidime	≤ 0.5	>128	>128
Ceftazidime/clavulanate	$\leq 0.12/4$	4/4	16/4
Ceftriaxone	≤ 0.5	>64	>64
Cefpodoxime	1	>64	>64
Cefozoplan	≤ 2	>16	>16
Cefoperazone/sulbactam	≤ 16	>32	>32
Aztreonam	≤ 0.5	>64	>64
Cefpirome	≤ 8	>16	>16
Cefepime	≤ 1	>32	>32
Cefoxitin	4	4	>32
Cefmetazole	2	2	16
Cefotetan	≤ 1	2	16
Imipenem	2	2	2
Meropenem	2	2	2
Flomoxef	≤ 8	≤ 8	≤ 8
Gentamicin	≤ 1	≤ 1	>8
Amikacin	≤ 4	≤ 4	≤ 4
Tobramycin	≤ 1	4	>8
Minocycline	2	8	>8
Levofloxacin	≤ 0.5	1	>4
Ciprofloxacin	≤ 0.25	2	>2
Fosfomycin	>16	16	≤ 4
Sulfamethoxazole/trimethoprim	≤ 2	>2	>2

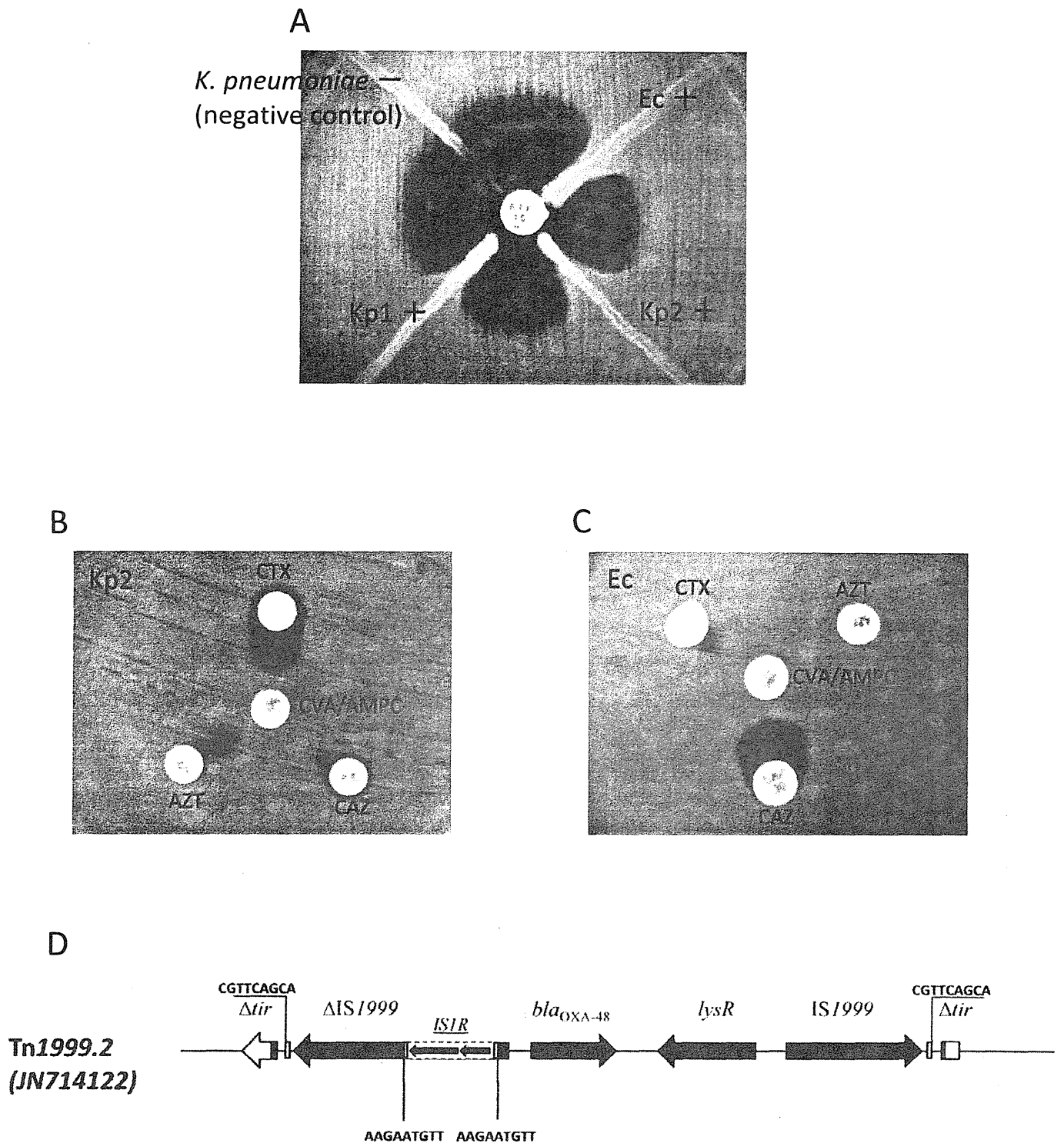


Fig. 1. (A) Phenotypic carbapenemase detection by modified Hodge test using a 10- μ g ertapenem disk. *K. pneumoniae* strains Kp1 and Kp2, and *E. coli* strain Ec are positive by this test. Negative control is included for comparison. (B) and (C) Double disk synergy tests for *K. pneumoniae* strain Kp2 and *E. coli* strain Ec. In both strains, atypical expansion of the growth-inhibitory zone around the CAZ or the CTX disk is observed toward a disk containing CVA/AMPC, suggesting probable production of ESBL. CAZ, ceftazidime (30 μ g); CTX, cefotaxime (30 μ g); AZT, aztreonam (30 μ g); CVA/AMPC, clavulanate/amoxicillin (10/20 μ g). (D) Genetic environments of the *bla*_{OXA-48} gene. PCR mapping and sequencing revealed the *bla*_{OXA-48} gene is located on Tn1999.2

新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 (免疫蛍光抗体法による β -lactamase 産生菌迅速検出法の構築)

研究分担者 荒川 宜親 (名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学/耐性菌制御学・教授)
研究協力者 川村 久美子 (名古屋大学大学院医学系研究科 医療技術学専攻 病態解析学講座・准教授)
研究協力者 横山 寛 (同上 大学院 M2)

研究要旨: 抗菌薬治療の切り札的存在であるカルバペネム系抗菌薬に耐性を示すグラム陰性桿菌の拡散が国内外で大きな問題となっている。本研究では検査材料からのカルバペネム耐性株の直接検出をめざし、蛍光抗体法を用いた metallo- β -lactamase (MBL) 産生菌検出法の構築を試みた。検出対象は IMP-型、VIM-型、NDM-型 MBL の 3 種類とし、それぞれに特異的なペプチド合成後、抗体を作製した。蛍光抗体染色法の手順は常法に従い、固定液の種類、前処理法およびブロッキングの条件、一次および二次抗体の濃度と時間について最適化を行なった。その結果、固定法はアセトンで 15 分、前処理法は 10 mM CaCl_2 を 30 分と 1% TritonX-100 を 15 分、ブロッキングは 10% BSA で 30 分、一次および二次抗体は各々 1,000 倍希釈で一時間反応させる条件で最も良好な染色像を得ることが確認された。本条件による蛍光抗体染色法を用いて、臨床分離株からの MBL の検出を試みたところ、感度・特異度ともに 100% の結果を得た。さらに病院感染の感染源となること多い尿検体からの直接検出の検討では、尿成分による非特異反応や阻害反応もなく、MBL 産生菌が混入する尿からのみ MBL 産生菌の明瞭な蛍光シグナルを得た。本法は、現行の MBL 検出法に比較して、迅速 (5 時間以内に検出)、簡便、そして対費用効果の高い検査法である。本法の臨床現場への導入は、感染制御の有用な指標として、さらに適切な抗菌薬治療開始の助けとなることが期待される。

A. 研究目的

病院感染症の起因菌として問題となっている metallo- β -lactamases (MBLs) 産生株を、蛍光抗体法を用いて迅速・簡便に検出する方法を構築する。

B. 研究方法

IMP-型、VIM-型、NDM-型 MBL の 3 種類のアミノ酸配列とその立体構造から、抗体作製に最適なエピトープを選択した。ウサギに免疫して特異抗体を作製後、それらを用いて蛍光抗体染色法の最適化を行い、臨床分離株および臨床検体 (尿) からの MBL 産生株の直接検出を試みた。

A. 研究結果

最適化の結果、固定法はアセトンで 15 分、前処理法は 10 mM CaCl_2 を 30 分と 1% TritonX-100 を 15 分、ブロッキングは 10% BSA で 30 分、一次および二次抗体の濃度および反応時間は

各々 1,000 倍希釈で一時間反応させる条件で最も良好な染色像を得た。本条件による蛍光抗体染色法で、ATCC 株 3 株の陰性ならびに臨床分離 MBL 産生菌 11 株の陽性が確認できた。作製した抗体の特異性を検討したところ、いずれの抗体も交差反応は認められず、目的とする MBL 産生菌のみを正確に検出することができた。本法による MBL 産生菌直接検出の検査材料として、尿検体を検討した。その結果、尿成分による非特異反応や阻害反応は認められず、MBL 産生菌が混入した尿からのみ MBL 産生菌の明瞭な蛍光シグナルを得た。

D. 考察

抗体の特異性については、染色体性 L1-型 β -ラクタマーゼ産生菌に微弱な蛍光シグナルが観察されたが、plasmid 性 MBL 産生菌とはシグナルの強さが有意に異なることから、両者の判別は可能と思われた。臨床材料からの直接検出では、明瞭な蛍光シグナルを得、その形態からグ

ラム陰性桿菌であることも容易に判定することができた。

E. 結論

本法は、迅速、簡便、そして対費用効果の高い検査法として実用化が期待される。本法の臨床現場への導入は、感染制御の有用な指標として、さらに、適切な抗菌薬治療開始の参考となり、適切な抗菌薬療法の向上に貢献することが期待される。

F. 健康危機情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 投稿準備中
2. 学会発表

第41回薬剤耐性菌研究会(下呂市, 2012)
横山覚、川村久美子、黒崎博雅、荒川宜親
免疫蛍光抗体法による β -lactamase産生菌迅速検出法の構築

第86回日本細菌学会総会(横浜, 2013)
発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきもの無し

免疫蛍光抗体法によるβ-lactamase産生菌迅速検出法の構築

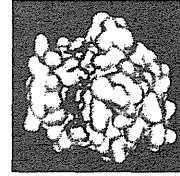
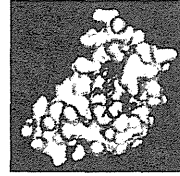
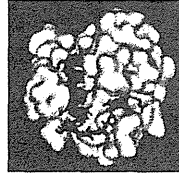
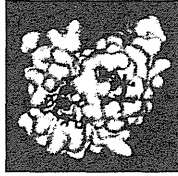
《研究目的》免疫蛍光抗体を用いて、β-lactamase産生菌を検出する方法を確立する。

最終目標として、尿や喀痰などの検査材料から直接β-lactamase産生菌を検出できるようにする。

《研究成果》

1. 抗体作成のための抗原ペプチドの合成

・IMP-型: 107-125AA ・VIM-型: 90-109AA ・KPC-型: 261-278AA ・NDM-型: 208-225AA



2. 反応条件の検討 (下線部の条件を検討した)

O/N culture 1 mL (1/10 MIC のIPM存在下で培養)

→ PBSで3回洗浄.

→ PBS (10 mM CaCl₂添加)に再懸濁, 氷上30min 放置.

→ スライドグラスに1白金耳量 (10 ml) 塗布, 風乾.

→ -30°Cのアセトンにて固定 (15min)後, PBSにて1回洗浄

→ 1% Triton / PBSにて 37°C, 15min 前処理.

→ 10% BSA, 30min ブロッキング

→ 一次抗体反応 (×1,000), 37°C, 1hr

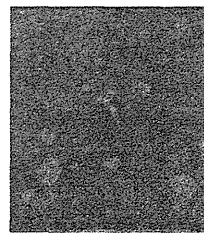
→ PBSで3回洗浄

→ 二次抗体 (蛍光標識)反応 (×1,000), 遮光, 37°C, 1hr

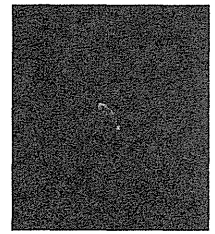
→ PBSで3回洗浄, 遮光

→ 封入後, 蛍光顕微鏡(×1,000)にて観察

左記条件にて染色した時の染色像
(IMP産生大腸菌)

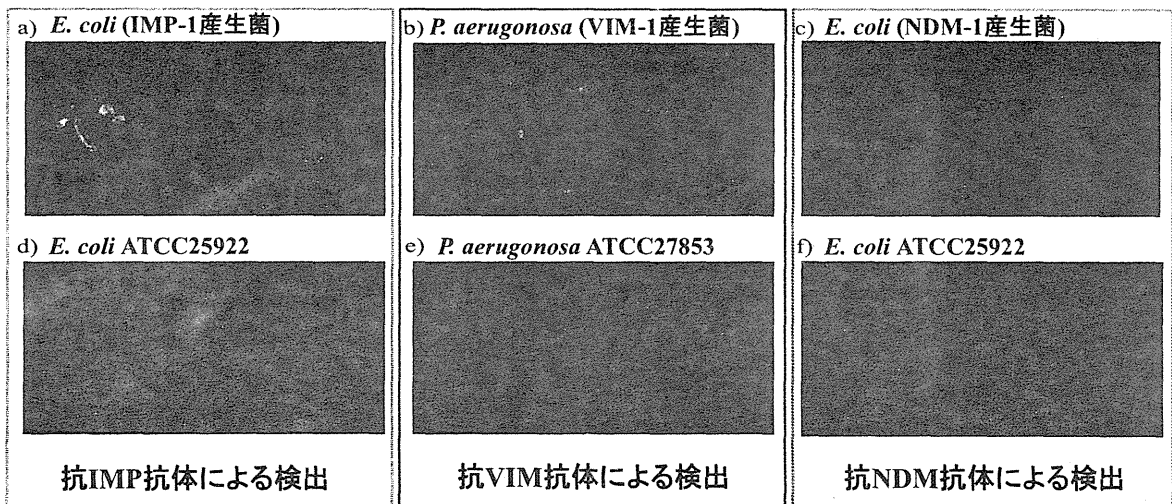


光学顕微鏡像



蛍光顕微鏡像

3. 各種抗体を用いたβ-lactamase産生菌の検出 (蛍光抗体法による染色像)

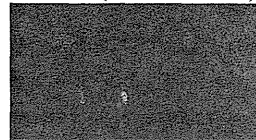


4. 尿検体からの直接検出

尿成分による反応阻害や非特異的反応もなく、検査材料からの直接検出 (4.5時間以内) が可能であった (右図は 蛍光抗体による染色像 a, c と生標本の光学顕微鏡像 b, d を示す)。

今後は血液培養ボトルや喀痰からの直接検出を検討する予定である。

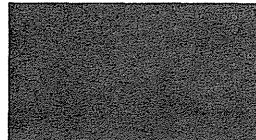
a) *E. coli* (IMP-1産生菌)



b)



e) *E. coli* ATCC25922



d)



新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 (健康人腸管内における基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌の 長期継続保菌に関する研究)

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学／耐性菌制御学・教授）
研究協力者 中根 邦彦（同上 大学院D1, 岡崎市保健所）
川村 久美子（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・准教授）

研究要旨：これまで、薬剤耐性菌は抗菌薬の多用により出現、選択されるものと考えられており、我国では抗菌薬の適正使用が推進されてきた。しかしながら、近年では抗菌薬曝露が比較的少ない市中感染症の起因菌からも耐性菌が分離されるようになり、なかでもESBL産生菌は外来の尿路感染症の原因菌として分離される頻度が高くなっている。また、細菌は基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)のような耐性遺伝子を持つプラスミドを獲得すると、抗菌薬の選択圧がない環境下ではプラスミドが欠落するか、菌そのものが消失すると考えられてきたが、日本の一般健康人からしばしばESBL産生菌が検出される現状において、この考え方は必ずしも全ての細菌に当てはまるとは考え難い状況にある。そこで本研究は、一般健康人におけるESBL産生菌の腸管内定着に焦点を当て、長期間継続して保菌されるESBL産生菌の状況を調査し、検出された菌の分子疫学的特徴を把握することで、早期の耐性菌封じ込め対策の実施に繋げ、市中環境へのさらなる拡散防止を図るものである。さらに、市中での耐性菌拡散の防止対策は、市中から病院環境への耐性菌の持ち込みを防ぐことにもなり、院内における薬剤耐性菌蔓延および院内感染の防止に資することが期待される。

A. 研究目的

近年、ESBL産生菌は、入院患者のみならず健康人からの分離報告も増加しており、特にCTX-MタイプのESBL産生大腸菌により起こる院内感染症や市中感染症の急速な増加は、2000年以降顕著であり、公衆衛生の見地からも注目されている。一般健康人におけるESBL保菌状況を把握するため、本研究では、健康人におけるESBL産生菌の長期腸管内定着に焦点を当て、継続的な保菌調査を実施した。

B. 研究方法

2010年1月から同年8月までに岡崎市保健所にサルモネラ、EHEC、赤痢菌の検査のために提出された便の中で、便提供者に対し本調査の目的等を説明し、同意が得られた検便(重複除く)2,563件(男性:1,050件/女性:1,513件)について解析を実施した。さらにこのうち、ESBL産生菌が検出された者については、2011年12月まで調査を継続した。cefotaxime 1μg/ml 添加マッコンキー寒天培地に発育し、double disk synergy testにてESBLの産生性が疑われた菌株について、菌種の同定、血

清型別、ESBL関連遺伝子の検索を行い、長期継続検出ESBL産生菌株については、さらにmultilocus sequence typing(MLST)解析およびInc typeの同定を実施した。

倫理面への配慮

本研究は、名古屋大学医学部／大学院医学系研究科医学研究に関する生命倫理委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

便提供者2,563名中122名(4.8%) (男性62名/女性60名)から合計149株(大腸菌145株)のESBL産生菌を検出した。そのうち、複数回の追跡検査が可能であった52名中13名(25%)において、数ヶ月に亘り、同一遺伝子タイプのESBL産生大腸菌の継続検出が確認され、性別および年齢の偏りは見られなかった。これら継続検出株の血清型およびMLSTは、O25:H4-ST131(4/13件)とO1:H6-ST648(3/13件)が主であり、ESBLの遺伝子型別はCTX-M-Gp.9(CTX-M-14, -27)(10/13件)であった。また、ESBL産生株の多くは多剤耐

性であり、13 株中 11 株はフルオロキノロン耐性を獲得していた。接合伝達性は 7 件で確認され、Inc type は Inc F(3/7 件)が多かった (Table 1)。

D. 考察

今回の調査により、継続検査が可能であった 52 例の ESBL 産生菌保菌者中 13 例 (25%) で長期保菌が確認されたことから、ESBL 産生菌が検出された 122 名の一般健常人について推計すると、30.5 人において ESBL 産生菌の長期保菌の可能性が考えられる。これは、2,563 名の 1.2% に相当し、これら継続保菌者が、市中における ESBL 遺伝子保有多剤耐性大腸菌のリザーバーとなる可能性がある。ESBL 産生菌はフルオロキノロンなどにも多剤耐性を獲得している傾向が見られるため、尿路感染症の治療時の抗菌薬の適正な選定のためにも、培養検査と薬剤感受性試験の必要性が高まるとともに、ESBL 産生株の医療機関へのさらなる侵入とアウトブレイクを阻止するため、市中の一般健常人における ESBL 産生菌の保菌状況についても今後継続的監視が必要になると考えられる。

E. 結論

今回の研究により、一般健常人の約 5% が ESBL 産生菌を保菌し、さらに 1.2% においては ESBL 産生菌の継続保菌の可能性が示唆された。国内の健常人における ESBL 産生菌の数ヶ月にわたる継続保菌率が示されたことは今回が初めてであり、2000 例を超える対象から得られた本調査結果は、基礎的データとして信頼性の高いものと考えられる。

お、今回用いた ESBL 産生菌のスクリーニング培地は、サルモネラ属菌や赤痢菌、病原性大腸菌の検出に一般的に使用されているマッコンキー寒天培地をベースとしたものであり、ESBL 産生菌の検出感度は、クロムアガー等に比べてやや劣るとも指摘されている。したがって、健常人における ESBL の実際の保菌率は、今回の結果より若干高い可能性も考えられる。市中における耐性菌の増加や薬剤耐性傾向を把握するためにも、今後、検出感度の高い適切なスクリーニング培地を用いて ESBL 産生菌の保菌状況の監視を続けることが重要と考えられる。

F. 健康危険情報

一般健常人の約 5% が ESBL 産生菌を保菌し、さらに 1.2% においては ESBL 産生株の長期保菌が確認され、その多くはフルオロキノロンにも耐性を獲得していた。したがって、尿路感染症の患者の治療にあたっては、細菌の培養検査と薬剤感受性試験を必ず実施し、その結果を確認して投与する抗菌薬を選択する必要がある。

G. 研究発表

準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

特記すべきもの無し

Table1. Characteristics of ESBL-producing *E. coli* isolates repeatedly recovered from 13 carriers

ID	Gender	Age	Serotype	MLST	Genotype of ESBL	Resistance profile	Replicon type (Donor)	Broth Mating	Replicon type (Plasmids carrying ESBL genes in transconjugants) ^b	Detection month ^a													
										2010												2011	
										1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	3	12
29	F	52	O1:H6	ST648	CTX-M-14	CPFX, LVFX, CTX, PIPC	ND	-				•	•	•									
66	F	50	O1:H6	ST648	CTX-M-14+TEM-1	CPFX, LVFX, MINO, CTX, PIPC	FIA, FIB	-			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
60	F	60	O1:H6	ST648	CTX-M-15+TEM-1	CPFX, LVFX, MINO, AZT, CAZ, CTX, PIPC	FIA, FIB, K, B/O	+	K	×	×	×	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
12	M	31	O25b:H4	ST131	CTX-M-27	CPFX, LVFX, MINO, CTX, PIPC	FIA, FIB	-			•					•							
64	M	53	O25b:H4	ST131	CTX-M-27	CPFX, LVFX, MINO, CTX, PIPC	FIA, FIB	+	FIB	•	•	•	•	×	×	•	×		×	×	×	×	
69	F	58	O25b:H4	ST131	CTX-M-27	CPFX, LVFX, CTX, PIPC	FIA, FIB	+	F	•	•	☆	•	•	×	•	×		×	×	×	×	
106	M	39	O25b:H4	ST131	CTX-M-27	CPFX, LVFX, MINO, CTX, PIPC	FIA, FIB	+	FIB		•	×	•	•	•	×		×	•	×	×	×	
82	M	68	OUT:H5	ST131	CTX-M-14+TEM-1	GM, CTX, PIPC	FIA, FIB	-			•	•	•	•		•		×		×	×	×	
88	F	45	OUT:H5	ST131	CTX-M-14+TEM-1	CPFX, LVFX, (GM), CTX, PIPC	I1, FIA, FIB	+	I1	•	•	•	•	•	△	•	•		•	×	×	×	
49	F	38	O15:H6	ST354	CTX-M-14+TEM-1	CPFX, LVFX, MINO, AZT, CTX, PIPC	FIA	+	ND	•	•	•	•		•	•		×	×	×	×	×	
87	M	52	O74:H6	ST38	CTX-M-14+TEM-1	CPFX, LVFX, CP, MINO, GM, CTX, PIPC	ND	-				•				•							
26	F	42	O78:HUT	ST23	CTX-M-15+TEM-1	CPFX, LVFX, MINO, AZT, CTX, PIPC	I1, FIB, P	+	ND		•	•	•										
50	F	59	OUT:H4	ST3407	CTX-M-15	AZT, CAZ, CTX, PIPC	FIB	-			•	•	•	•	•	•	•	△	×	×	×	×	×

^a ●, Detection of ESBL-producing *E. coli*; ×, Non-detection of ESBL-producing *E. coli*; ☆, Antimicrobial agents administration; △, Oversea travel. ^b ND, Not Detected.