

していると考えられる。さらに OH は Asp101 と水素結合を形成して固定化され、OH の  $\beta$ -ラクタム剤への求核攻撃に寄与していると推定される。

活性中心には Zn1 と Zn2 に加え、さらにもう一つの Zn(II)イオン(Zn3)が存在している。これは結晶化の際に 5 mM の硝酸亜鉛を添加したことによるものと考えられる。ここで興味深いことは、Zn1 と Zn3 への His99 の配位様式である。Zn3 には His99、His190 と 2 つの水分子が配位して歪んだ四面体構造を形成している。His99 は Zn1 と Zn3 へ架橋して配位しており、イミダゾレートの状態になっていると推定される。

KHM-1 の Zn1 と Zn2 の占有率はそれぞれ 1.0 と 0.7 であることから、Zn2 は Zn1 よりも結合親和性が低く活性中心から抜けやすいことが考えられる。

KHM-1 と IMP-1 のループ 2 の構造比較から、KHM-1 は IMP-1 に比べループ 2 は活性中心から離れた位置にあり(図 4)、広い活性ポケットを形成していると考えられる。その結果として、嵩高い置換基を分子内に持つ  $\beta$ -ラクタム剤(セフトジジム(図 5))を活性ポケットに受け入れやすくなっていると考えられる。KHM-1 と IMP-1 のセフトジジムに対する  $K_m$  値はそれぞれ 8  $\mu$ M と 44  $\mu$ M であり、KHM-1 の方が IMP-1 よりもセフトジジムに対する親和性が約 5.5 倍ほど高いことから示唆される。

基質特異性発現には Zn2 配位子である His217 の柔軟性も大きく関与していると考えられる。この柔軟性を与える一つの因子として、216 位のアミノ酸残基とその近隣のアミノ酸残基との水素結合形成が重要でと考えられる。例えば IMP-1 では 216 位は Ser であり(図 1)、Lys89 と水素結合を形成することで His217 が固定化されると推定される。一方、KHM-1 では Ser216 が Gly216 に置換し、これに加え 218 位も Gly になっている。従って、2 つの Gly によって挟まれた His217 の柔軟性(可動性)は高まると考えられる。これにより、IMP-1 とは異なる基質特性を発現する一つの要因であると考

えられる。

## E. 結論

本研究では、日本で発見された *Citrobacter freundii* 由来の KHM-1 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの分子構造を 1.94 Å の分解能で決定した。KHM-1 と IMP-1 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼとの構造比較から、ループ 2 構造の違いによって活性中心ポケットは IMP-1 に比べ広がっていることがわかった。これにより、セフトジジムやセフトキシムのような嵩高い置換基を持つ  $\beta$ -ラクタム剤を活性中心ポケットに取り込みやすくなっていることがわかった。

本年度は KHM-1 の分子構造を決定することができたが、KHM-1 はセフトジジムとセフトキシムの加水分解効率は  $k_m$  よりむしろ  $k_{cat}$  の方が効いている(表 1):つまり遷移状態の酵素-基質複合体(ES complex)から生成物と遊離酵素への分解過程が速くなっている。

そのため、今後は Gly216 や Gly218 変異体などを調製し、それら変異体の各種  $\beta$ -ラクタム剤に対する精密な速度論解析および熱測定を行う予定である。それにより、野生型と変異型の遷移状態における活性化自由エネルギーを算出し、分子構造との相関を明らかにしたいと考えている。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Wachino, J.-I., Yamaguchi, Y., Mori, S., Kurosaki, H., Arakawa, Y., Shibayama, K. Structural insights into the subclass B3 metallo- $\beta$ -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor mercaptoacetate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):101-109.

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

#### I. 参考文献

1. Sekiguchi, J., Morita, K., Kitao, T., Watanabe, N., Okazaki, M., Miyoshi-Akiyama, T., Kanamori, M., Kirikae, T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- $\beta$ -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 2008, Nov;52(11);4194-4197.

表1. KHM-1とIMP-1メタロ-β-ラクタマーゼによる4種のβ-ラクタム剤の加水分解反応における速度論的パラメーターの比較

Substrate	MBL	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Relative $k_{\text{cat}}/K_m$
Benzyl penicillin	IMP-1 <sup>(2)</sup>	520	320	$6.2 \times 10^5$	1
	KHM-1 <sup>(1)</sup>	1,340	23	$1.7 \times 10^4$	1
Cefotaxime	IMP-1 <sup>(2)</sup>	4	16	$4.0 \times 10^6$	6
	KHM-1 <sup>(1)</sup>	13	2,181	$1.7 \times 10^8$	<b>10000</b>
Ceftazidime	IMP-1 <sup>(2)</sup>	44	8	$1.8 \times 10^6$	3
	KHM-1 <sup>(1)</sup>	8	118	$1.8 \times 10^7$	<b>1000</b>
Imipenem	IMP-1 <sup>(2)</sup>	39	46	$1.2 \times 10^6$	2
	KHM-1 <sup>(1)</sup>	268	15	$5.6 \times 10^4$	3

(1) J. Sekiguchi *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 4194-4197 (2008)

(2) D. Yong *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 5046-5054 (2009)

表2. Data Collection statistics

Resolution (Å)	50.0–1.94 Å
Wavelength (Å)	1.0000
Space Group	P4 <sub>1</sub>
Refinement statistics	
R <sub>working</sub> (%)	0.188
R <sub>free</sub> (%)	0.230

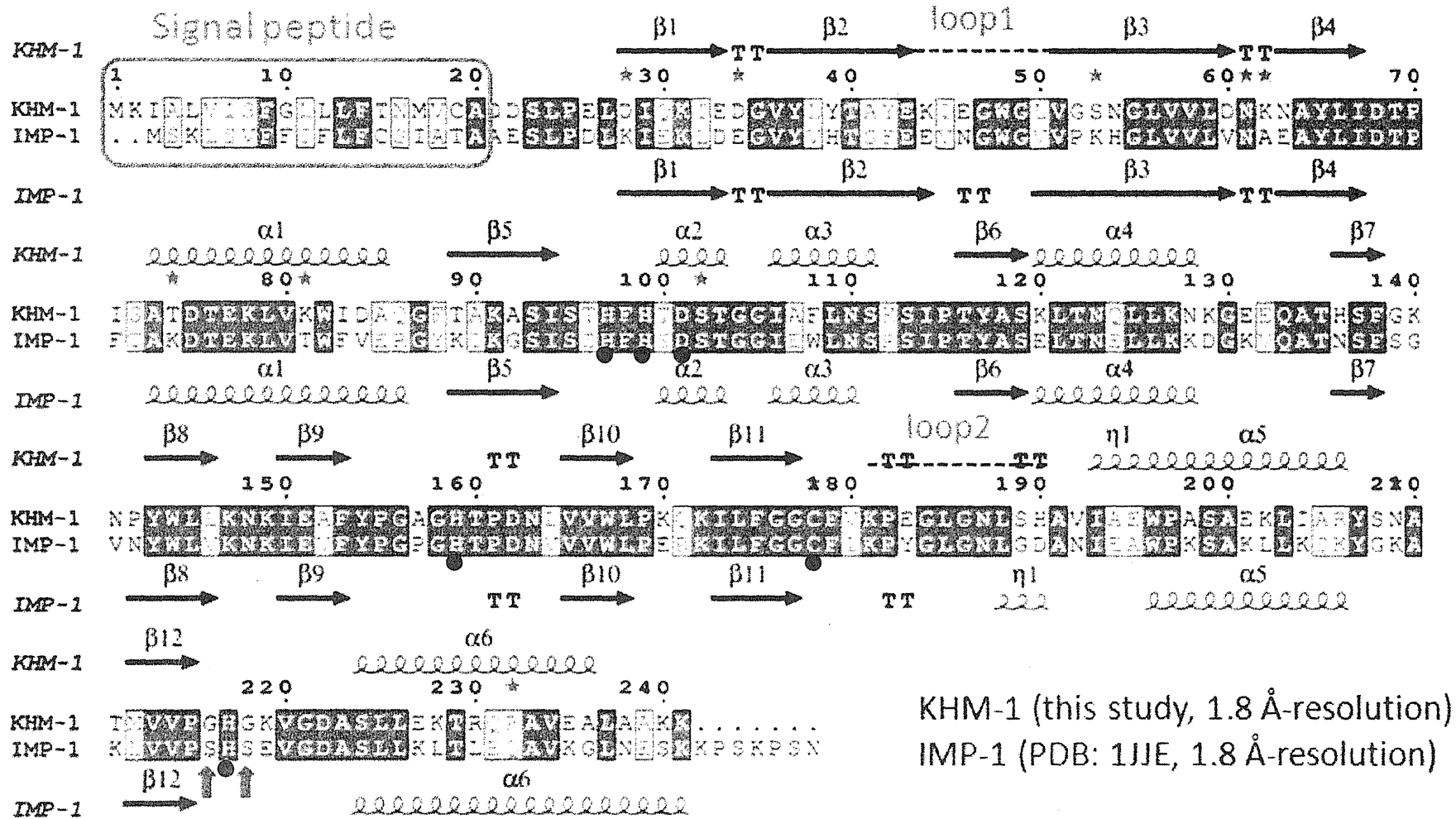


図1. KHM-1とIMP-1のアミノ酸配列の比較: ●はZn1とZn2へ配位しているアミノ酸残基を示す。

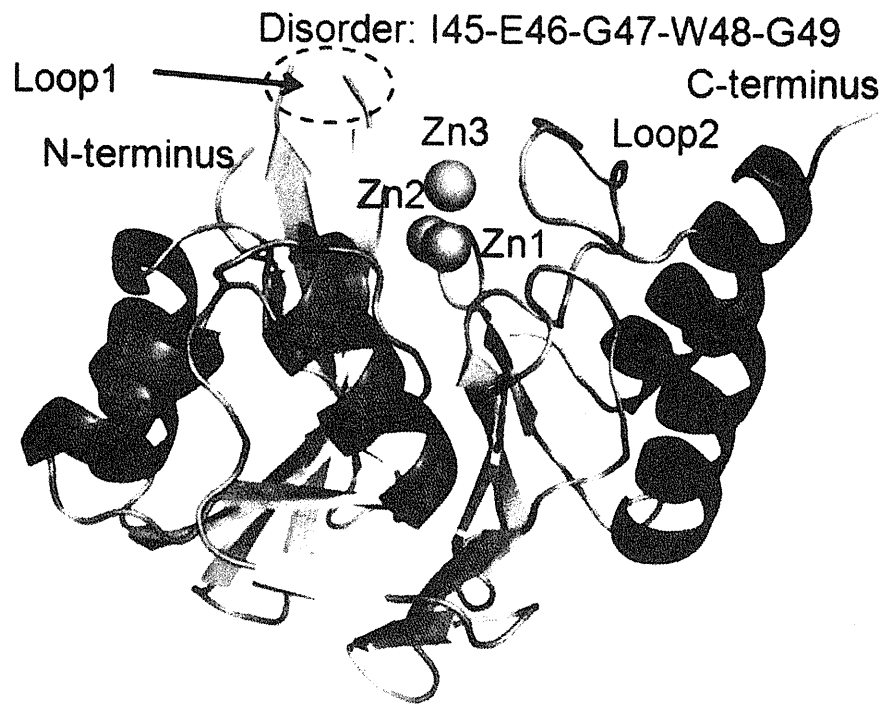


図2. KHM-1の全体構造:Ile45-Glu46-Gly47-Trp48-Gly49の領域はdisorderしている。活性中心部位には3つのZn(II)イオンが存在している。

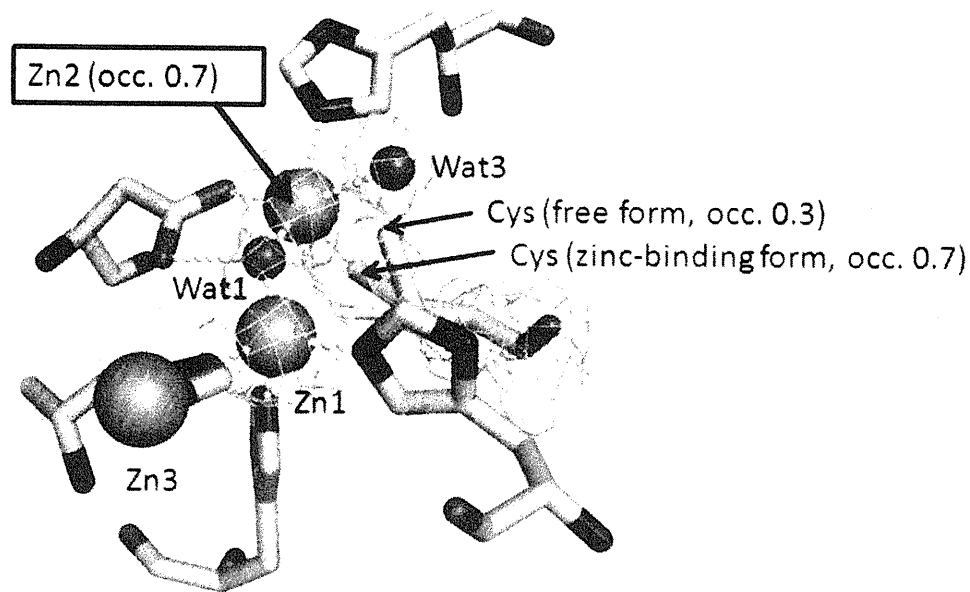


図3. KHM-1の活性中心構造:Cys178は2つのコンフォメーションをとっていた。1つはZn2への配位型(占有率は0.7)、もう1つは非配位型(占有率は0.3)である。活性中心部位には3つのZn(II)イオンが存在し、Zn1、Zn2とZn3の占有率はそれぞれ1.0、0.7、1.0とした。

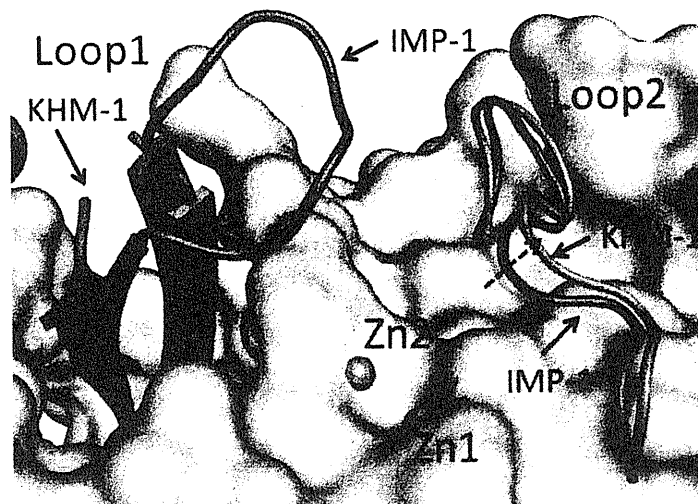


図4. KHM-1とIMP-1のループ2領域の構造比較:  
 KHM-1のAsn187はIMP-1のAsn187よりも活性中心から約  
 1.4Åほど離れていた。

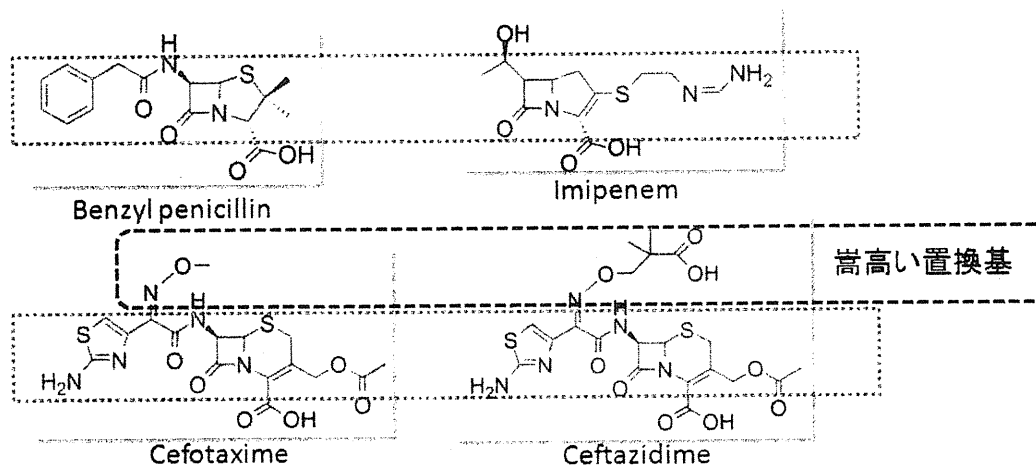


図5. ベンジルペニシリン、イミペネム、セフォタキシムとセフトアジジムの化学構造

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）  
研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所）  
研究協力者 清水美和子（富山県衛生研究所）  
研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）  
研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）

#### 研究要旨

*Acinetobacter* 属菌、特に *Acinetobacter baumannii* complex を構成する 4 つの *genospecies* (*A.baumannii*, *A.calcoaceticus*, *A.genospecies 3*, *A.genospecies 13TU*) を迅速に型別する方法を検討した。本年度は、*gyrB* 遺伝子をターゲットとした LinePCR 法を開発し、その型別能力を検討した。今回の検討では、4 つの *genospecies* を完全に識別はできなかったが、その有用性が示唆された。また、本方法の開発及びその評価をするためにアシネトバクター属菌の臨床分離 50 株の薬剤感受性試験及び薬剤耐性関連遺伝子の有無を検証する PCR 試験を実施したので併せて報告する。

#### A. 研究目的

アシネトバクター(*Acinetobacter*)による感染症で臨床的に最も重要なのは *Acinetobacter baumannii* である。*Acinetobacter* の鑑別について医療機関等で汎用されている自動同定機器では種を正しく同定することは難しく、ほぼ同様な生化学的性状を示す *A.calcoaceticus*, *Acinetobacter genospecies 13TU* (*A.nosocomialis*), *Acinetobacter genospecies 3* (*A.pittii*) としばしば混同して検出され、*A.baumannii* complex (ABC) と呼ばれることもある。

本研究では、ABC を構成する上記 4 つの *genospecies* (GS) を迅速に型別することを可能にする PCR ベースの方法を開発する。

#### B. 研究方法

##### B-1 Line PCR 法

PCR は、新規に開発した LinePCR 法 (IUMS 2011, 6-10 September, Sapporo) を用いて検討した。

##### B-2. 供試菌株および供試 DNA

臨床分離 *A.baumannii* 8 株 (Ab1~8) は、感染研細菌第二部から分与を受けた。また、型別法の開発と評価のために、*Acinetobacter* spp. 50 株

(Ab25~74, 民間検査会社より買上) を用いた。この 50 株については、喀痰から 23 株、咽頭拭い、カテーテル尿から各々 5 株が分離されており、その他は、膺分泌物、中間尿、褥瘡、耳漏、鼻汁、

子宮内、静脈血、皮膚から各々 1~3 株分離されたものである。

*Acinetobacter* 属菌の陽性コントロールとして、感染研細菌第二部より、*A.baumannii*, *A.GS3*, *A.GS 13TU*, 及び *A.calcoaceticus* 由来のゲノム DNA の提供を受けた。

##### B-3. 培養と DNA 抽出

トリプチケースソイ寒天培地で生育させた新鮮コロニーの一部を 100 $\mu$ L 5% (W/V) キレックス 100 に懸濁し、100 $^{\circ}$ C 10 分間処理を行い、遠心上清を PCR の鋳型とした。

PCR は、市販 Multiplex PCR Amplification Kit (Qiagen) あるいは KODFX (Toyobo) を使用した。

##### B-4. 感受性試験

供試菌株の薬剤感受性試験は、センシディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用い、セフトキシム (CTX), セフトジジム (CAZ), イミペネム (IPM), メロペネム (MEPM), アズトレオナム (AZT), セフェピム (CFPM), ピペラシリン (PIPC), アミカシン (AMK), シプロフロキサシン (CPFX), ミノサイクリン (MINO), コリスチン (CL), スルフィソキサゾール (G) の 12 ディスクを使用した。

##### B-5. PCR

*Acinetobacter* spp. 50 株 (Ab25~74) については、OXA-51, OXA-23 及び *integrase* 遺伝子の存在につ



いて PCR を実施した (AAC, 43:693, 1999)。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者情報を切り離した臨床分離株のみを用いているため、倫理上の問題は発生しない。

## C. 研究結果

### C-1. *A. baumannii* complex – genospecies (ABC-GS) typing のための LinePCR 用プライマーの設計

*gyrB* 遺伝子を型別 (typing) のためのターゲット遺伝子として、プライマーの設計を行った。

*gyrB* 遺伝子の配列は Yamamoto ら

(*Int.J.Syst.Bacteriol.*, 49:87-95, 1999) の配列を用いた。今回、解析に使用した配列の Accession No. は、*A. baumannii* (GS2) 由来の配列は、AB008684, AB008699, AB008700, *A. calcoaceticus* 由来配列は、AB008685, AB008702, AB008701, *A. GS3* 由来配列は、AB008704, AB008703, AB008686, 及び *A. 13TU* 由来配列は、AB008708, AB008706, AB008705 である。

これらの配列を多重配列させ (Figure 1)、LinePCR のプライマーを設計する位置として、Site A~D を選定して、GS を特異的に認識することができるプライマーを設計し、LinePCR を可能となるように作成したオリゴを混合した。(Figure 2 及び Table 1)。ただし、Table 2 中の Ac#4-6 プライマーの SiteD を検出するプライマーは、公的データベースからこの領域の配列が得られなかったため今回は省略した。従って、Ac#4-6 プライマーは 6 本のオリゴプライマーで構成されている。

### C-2. プライマーの評価

Table 2 で示した 4 つの GS に特異的に検出するように設計した 4 つのプライマー混合溶液の特異性を、臨床分離 8 株 (Ab1~8) を用いて調べた。

今回、使用した鋳型 DNA はいずれも *A. baumannii* であり、Ac#1-8 のプライマーセットのみ増幅物が観察され、その他のプライマーセットは全く反応しなかった (Figure 3)。しかし、結合部位の異なる複数のプライマーを完全に相補的な形で使用しており、Figure 2 で示すように、添加したすべてのプライマーが増幅に関与するとすれば、約 250~800bp の増幅物が 3 本程度 (Figure 2 の a, b, c) 検出されると予想されたが、Ac#1-8 プライマーの増幅物は約 500bp であった。

### C-3. *Acinetobacter* 属菌 (ABC) の標準 DNA を鋳型として使用した場合のプライマーの評価

*Acinetobacter* 属菌の標準 DNA を用いて LinePCR 用プライマー混合液 (Table 2) を特異性を調べた。その結果、GS13TU 検出用に作製した Ac#4-6 はいずれの DNA に対しても全く増幅しなかったが、他のプライマー混合液はほぼ GS 特異的な増幅物が得られた。その増幅物の電気泳動像から、Figure 2 に示した増幅物 b がよく増幅していた。また、*A. baumannii* と GS13TU、GS3 と *A. calcoaceticus* の鋳型を用いたとき、使用したプライマーが相互に反応し、増幅物が観察された。

### C-4. 型別法評価のために使用する *Acinetobacter* spp.50 株の解析

この 50 株 (Ab25~Ab74) の薬剤感受性試験の結果は Table 3 に示した。

OXA-51 PCR 陽性は 31 株、そのうち 16 株は integrase (*int1*) も PCR 陽性となった。OXA-23 PCR 陽性株は検出されなかった。また、OXA-51 及び integrase PCR 陽性株は使用薬剤 CTX, CAZ, MEPM, PIPc, AMK, CPFx, G に耐性で多剤耐性傾向を示した。

## D. 考察

### D-1. *A. baumannii* complex – genospecies (ABC-GS) typing

ABC-GS を型別するプライマーを特定するために、比較的多くの遺伝子配列が報告されている *gyrB* 遺伝子をターゲットとした LinePCR プライマーを設計 (Table 1, 2) し、検討した。今回の結果から、完全に ABC-GS に含まれる 4 つのアシネトバクターの型別は確認できなかったが、特異的な LinePCR の増幅物が得られることから、GS 特異的なプライマーの検索が可能であることが示唆された。PCR を用いて型別する場合、特定の遺伝子をターゲットとしてよく実施されるが、この ABC-GS の型別は、生化学的な特徴はほとんど同じで、同定が難しいことから、複数の遺伝子をターゲットとし、さらに GS 特異的な SNP 等を利用して、Multilocus site を検出することで、安定な型別を可能にすると思われる。従って、複数の site を同時にターゲットとする LinePCR 系は、この型別法に最適な方法になると期待される。また、相

補的なプライマーとして添加していることから、ゲノム上のアニーリング部位上と完全に一致する場合のみ、効率的に増幅することを利用した方法であり、今回、試みた *gyrB* 遺伝子以外の遺伝子、たとえば *rpoB* 遺伝子を検出する LinePCR 系を行い、ABC-GS 間の特異的な配列を検索することにより、ABC-GS 型別を迅速に実施する LinePCR 系を開発したい。

#### E. 結論

ABC-GS 型別を行うために LinePCR が有用であることが示唆された。

#### 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

なし。

Table 1. *gyrB* 遺伝子を検出するためのプライマー配列

Primer No.	Primer Name	Sequence (5' → 3')	Target GS <sup>a</sup>
2447	AB_gB319f	GAGCATGTGTATGACTATGAAGG	bau
2448	AB_gB319r	CCTTCATAGTCATACACATGCTC	bau
2449	AG3_gB319f	GAGCACGTATATGACTACGAAGG	GS3
2450	AG3_gB319r	CCTTCGTAGTCATATACGTGCTC	GS3
2451	AC_gB319f	GAACATGTATAAGACTACGAAGG	cal
2452	AC_gB319r	CCTTCGTAGTCTTATACATGTTT	cal
2453	AT13_gB319f	GAACATGTTTATGACTATGAAGG	13TU
2454	AT13_gB319r	CCTTCATAGTCATAAACATGTTT	13TU
2455	AB_gB636f	GGTGATGATGCGCGTGAAGGT	bau&13TU
2456	AB_gB636r	ACCTTCACGCGCATCATCACC	bau&13TU
2457	AG3_gB636f	GGCGATGATGCACGTGAAGGT	GS3
2458	AG3_gB636r	ACCTTCACGTGCATCATCGCC	GS3
2459	AC_gB636f	GGCGACGATGCACGTGAAGGT	cal
2460	AC_gB636r	ACCTTCACGTGCATCATCGCC	cal
2461	AB_gB883f	CCGTAAGAGTGCATTAGATATTG	bau
2462	AB_gB883r	CAATATCTAATGCACTCTTACGG	bau
2463	AG3_gB883f	TCGTAAGAGTGCCTTGATATTG	GS3
2464	AG3_gB883r	CAATATCAAGTGCCTTACGA	GS3
2465	AC_gB883f	TCGTAAGAGCGCACTTGATATTG	cal
2466	AC_gB883r	CAATATCAAGTGCCTTACGA	cal
2467	AT13_gB883f	TCGTAAGAGTGCATTAGATATCG	13TU
2468	AT13_gB883r	CGATATCTAATGCACTCTTACGA	13TU
2469	AB_gB1125f	GGCTGTGGTATTGGCCGTGAA	bau
2470	AB_gB1125r	TTCACGGCCAATACCACAGCC	bau
2471	ACG3_gB1125f	GGCTGTGGTATTGGTCGTGAA	GS3 & cal
2472	ACG3_gB1125r	TTCACGACCAATACCACAGCC	GS3 & cal

<sup>a</sup> GS, genospecies; bau, *A.baumannii*; GS3, *A.GS3 (A.pittii)*; 13TU, *A.GS13TU (A.nosocomialis)*

Table 2. *gyrB* 遺伝子をターゲットとした ABC-GS 型別のために設計した LinePCR 用プライマー液の構成

Primer Mix# <sup>a</sup>	Target GS <sup>b</sup>	A	B	C	D
Ac#1-8	<i>A. baumannii</i>	2447 <sup>c</sup>	2455	2461	2469
		2448	2456	2462	2470
Ac#2-8	<i>A. calcoaceticus</i>	2451	2459	2465	2471
		2452	2460	2466	2472
Ac#3-8	<i>A. GS3</i>	2449	2457	2463	2471
		2450	2458	2464	2472
Ac#4-6	<i>A. GS 13TU</i>	2453	2455	2467	-
		2454	2456	2456	-

<sup>a</sup> last digit in label is indicated the number of primers used in this PCR.

<sup>b</sup> GS, genospecies

<sup>c</sup> the codes are indicated as "Primer No." in Table 1.

Table 3. *Acinetobacter* 属菌 50 株の特徴

Strain	Source	Disk drug susceptibility test												PCR		
		CTX	CAZ	IPM	MEPM	AZT	CFPM	PIPC	AMK	CPFX	MINO	CL	G	Oxa51	Oxa23	int1
Ab25	sputum	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	+	-	+	
Ab26	sputum	I	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	+	-	-	
Ab27	urine	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	-	
Ab28	urine	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	-	
Ab29	sputum	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	+	-	+	
Ab30	sputum	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab31	sputum	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	-	
Ab32	sputum	R	R	S	S	R	I	R	R	I	S	R	+	-	+	
Ab33	pharynx	I	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	-	-	-	
Ab34	pharynx	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	-	
Ab35	sputum	R	R	S	S	R	R	R	R	I	S	R	+	-	+	
Ab36	vaginal fluid	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab37	vaginal fluid	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab38	mucus	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	-	-	-	
Ab39	sputum	I	S	S	R	I	S	S	S	S	S	R	-	-	-	
Ab40	sputum	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	-	-	-	
Ab41	pharynx	I	S	S	R	S	S	S	S	R	I	S	R	-	-	
Ab42	otorrhea	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab43	catheter urine	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	S	R	+	-	+
Ab44	sputum	R	R	S	R	R	I	R	R	R	I	S	R	+	-	+
Ab45	bed sore	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	S	R	+	-	+
Ab46	sputum	R	R	S	I	R	I	R	R	R	S	S	R	+	-	+
Ab47	catheter urine	I	S	S	S	R	I	I	S	S	S	S	+	-	-	
Ab48	midstream urine	I	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab49	vaginal fluid	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab50	sputum	I	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	-	-	-	
Ab51	ureteral catheter	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	+	-	-	
Ab52	otorrhea	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	-	-	-	
Ab53	sputum	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	+	-	+	
Ab54	midstream urine	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab55	bed sore	R	R	I	R	R	S	R	R	S	S	R	+	-	+	
Ab56	sputum	R	I	R	R	R	R	R	S	R	S	R	-	-	-	
Ab57	sputum	R	R	I	R	R	R	R	R	I	S	R	+	-	+	
Ab58	sputum	R	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	+	-	+	
Ab59	sputum	R	R	I	R	R	I	R	R	R	S	S	R	+	-	+
Ab60	sputum	R	R	I	R	R	I	R	R	R	S	S	R	+	-	+
Ab61	sputum	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	-	-	-	
Ab62	pharynx	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	-	-	-	
Ab63	oral cavity	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	-	-	-	
Ab64	sputum	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	S	R	+	-	+
Ab65	sputum	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	+	-	+
Ab66	sputum	I	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	-	
Ab67	venous blood	I	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	-	
Ab68	catheter urine	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab69	sputum	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	-	
Ab70	otorrhea	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab71	skin	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	-	
Ab72	catheter urine	R	R	S	S	R	I	R	S	R	S	S	+	-	-	
Ab73	uterus fluid	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	
Ab74	midstream urine	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	+	-	-	

R, resistant; I, intermediate; S, sensitive

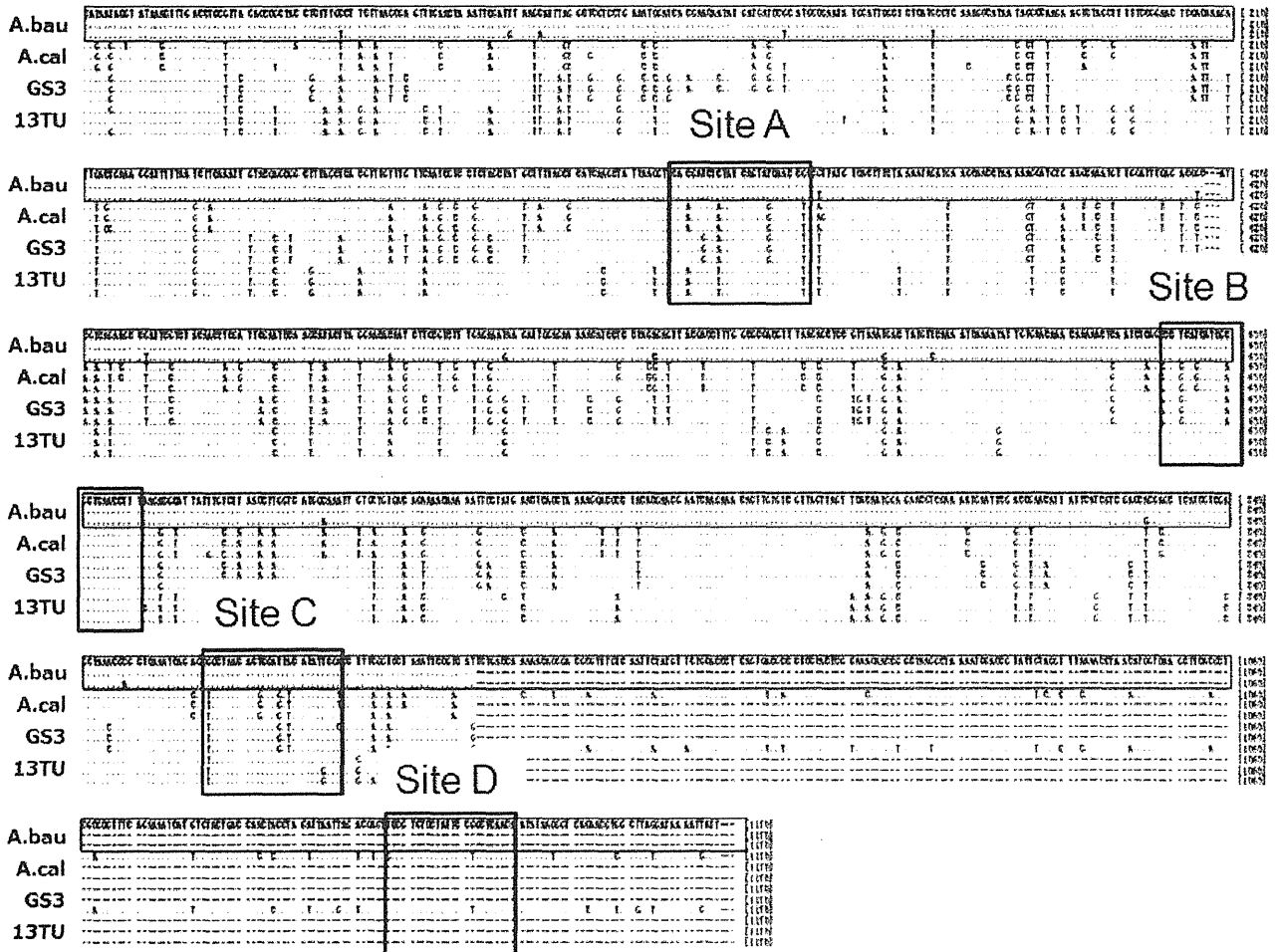


Figure 1. *Acinetobacter* 属菌の *gyrB* 配列の多重配列と PCR 用プライマーのターゲット領域 (SiteA~D)

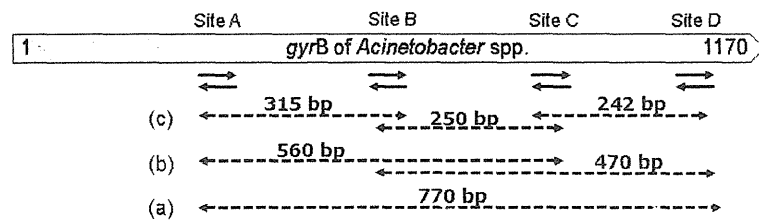


Figure 2. *Acinetobacter* 属菌の *gyrB* 遺伝子と LinePCR の推定増幅物

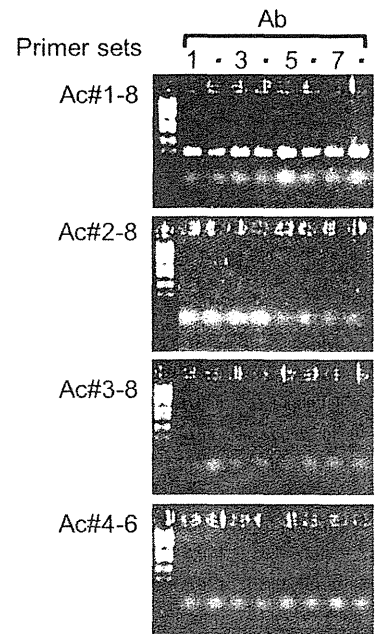


Figure 3. GS 特異的 LinePCR 用プライマーの評価

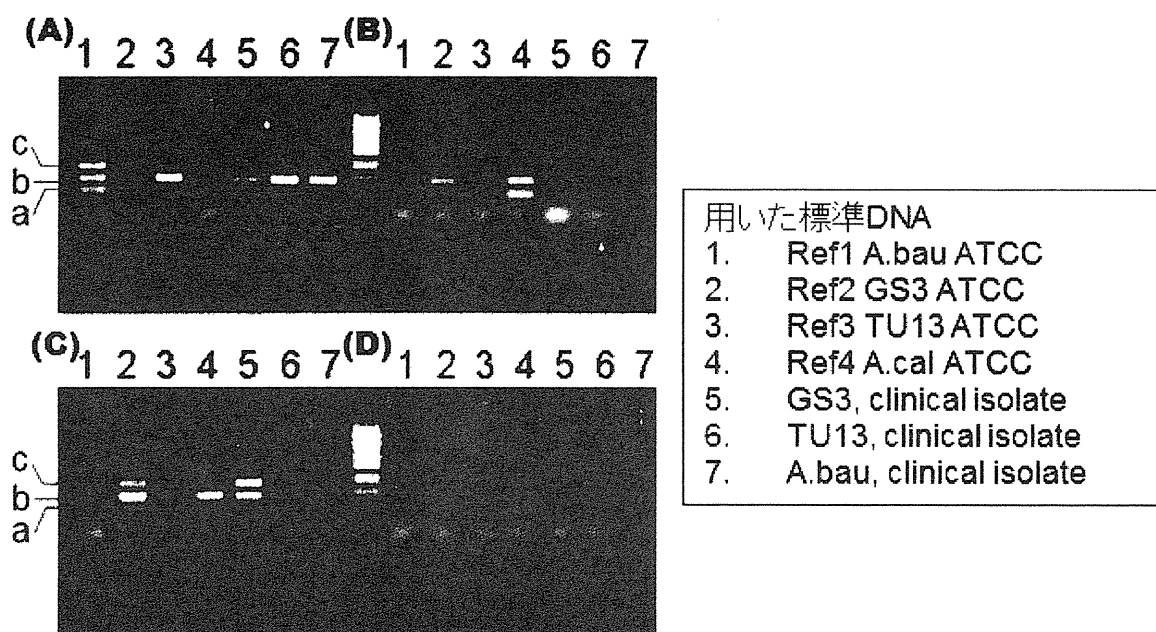


Figure 4. *gyrB* 遺伝子をターゲットとした LinePCR による ABC-GS 型別標準 DNA (lane 1~7) を鋳型として、用いたプライマー混合液は(A)Ac#1-8, (B)Ac#2-8, (C)Ac#3-8, (D)Ac#4-6 を使用した (詳細は、Table 2 を参照のこと)。

地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究 「アシネトバクター属菌の感染疫学解明に関する研究」

研究協力者 八柳 潤 （秋田県健康環境センター）

研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）

#### 研究要旨.

国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的として、秋田県と愛知県の医療機関において分離されたアシネトバクター属菌の菌種同定と薬剤感受性について検討した。*rpoB* 遺伝子のシークエンスと菌種が良好な関連を持つことが示され、また、OXA51 like 遺伝子が *A. baumannii* のマーカーとして有用であることが確認された。秋田県と愛知県で分離されたアシネトバクター属菌の菌種分布に明瞭な違いがあることが示され、地域に特有の感染疫学が存在している可能性が示唆された。感染症法に定める MDRA は検出されなかったが、5 剤以上の薬剤に耐性を獲得した *A. baumannii* が検出され、これらの菌は医療機関において院内感染原因菌などとして問題になる可能性が高い。重篤な感染症に発展する可能性が高い、アシネトバクター属菌による血液感染の発生状況について、今後もデータを集積する必要がある。

#### A. 研究目的

アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属菌は湿潤環境を好み、自然環境中に広く分布する。アシネトバクター属の細菌は、遺伝子的な分類により 19 の "Geno species;GS" に分類され、GS 2 のアシネトバクター-バウマニ (*Acinetobacter baumannii*)、GS 3 (*Acinetobacter pittii*)、GS 7 の *Acinetobacter johnsonii*、GS 8 の *Acinetobacter lwoffii* 等の分離頻度が高いとされる。しかし、医療機関等で汎用されている自動同定機器や従来の生化学的性状試験ではアシネトバクターの種を正しく同定することは困難であり、このことがアシネトバクター感染対策上の問題の一つとなっている。JANIS の集計は医療機関における自動同定機による検査結果に立脚しているために、国内におけるアシネトバクター属菌の分離実態を正確に把握しているとは言い難く、その実態は混沌としているのが現状である。

一方、2008 年秋から 2009 年 1 月に福岡大病院で多剤耐性アシネトバクターの院内感染が発生し、26 人が感染し 4 人が死亡するという院内感染事例が発生し、平成 22 年 2 月には帝京大学医学部附属病院で入院患者 46 名が多剤耐性アシネトバクターに感染し、死亡者が計 27 名となる深刻な健康被害が発生した。このように、アシネトバクターは、既に国内で深刻な健康被害を伴う院内感染を惹起しており、健康被害発生予防対策を講じる必要があるが、国内におけるアシネトバクター属菌の分離実態さえも正確に把握されているとは言い難いのが現状である。

本研究は、国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学に関する知見を得ることを目的として実施した。研究初年度である今年度は、秋田県と愛知県の医療機関において分離されたアシネトバクター属菌の菌種同定と薬剤感受性について調査を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

#### 秋田県

2012年4月から2013年1月まで、秋田県の医療機関（市立秋田総合病院：36株、中通総合病院：7株、由利組合総合病院：10株、大館市立総合病院：12株、そして臨床検査センターである秋田県総合保健事業団：83株）から分与を受けたアシネトバクター臨床分離株、合計148株を供試した。

#### 愛知県

2002年から2011年まで、愛知県の医療機関（名古屋医療センター：63株、安城厚生病院：39株、東名古屋病院：1株）から分与を受けたアシネトバクター臨床分離株、合計103株を供試した。

### 2. 菌種同定

Bernard La Scola らが報告(J. Clin. Microbiol., Vol.44, p. 827-83, 2006)した *rpoB* 遺伝子のシーケンス解析により実施した。

### 3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験はKB法により実施した。供試薬剤はセフトキシム (CTX), セフトジム (CAZ), イミペネム (IPM), メロペネム (MEPM), アズトレオナム (AZT), セフェピム (CFPM), ピペラシリン (PIPC), アミカシン (AMK), シプロフロキサシン (CPFX), ミノサイクリン (MINO), コリスチン (CL), スルfoisキサゾール (G)とした。

### 4. MLST 解析

愛知県で分離された *A. baumannii* のうち13株を、パスツール研究所 ([www.pasteur.fr/mlst](http://www.pasteur.fr/mlst)) の方法に従って MLST 解析した。

## C. 研究結果

### 1. アシネトバクター属菌分離状況

図1に *rpoB* 遺伝子配列による進化系統樹を示す。また、秋田県及び愛知県で分離されたアシネトバクター属菌の菌種を表1に示す。

秋田県で分離された148株中 *A. baumannii*

が68株(45.9%)と最も多く、*A. nosocomialis* が34株(23.0%)、*A. pittii* が22株(14.9%)、菌種未定の *Acinetobacter* sp. Close to 13TU が13株(9.1%)と続いた。分離株の由来を表2に示す。咽頭由来株が69株と最も多く、尿由来株が20株、咽頭由来株が11株と続いた。血液由来株は7株であり、その内訳は *A. nosocomialis* が6株、*A. baumannii* が1株であった。

愛知県で分離された103株中 *A. nosocomialis* が40株(38.8%)と最も多く、*A. baumannii* が25株(24.3%)、*A. radioresistens* が24株(23.3%)、菌種未定の *Acinetobacter* sp. close to 13TU が6株(5.8%)と続いた。

### (倫理面への配慮)

本研究は、患者情報を切り離れた臨床分離株のみを用いているため、倫理上の問題は発生しない。

### 2. 分離株の薬剤耐性

図2に *A. baumannii* とそれ以外のアシネトバクター属菌の薬剤耐性を示す。*A. baumannii* では5剤、6剤、7剤、8剤耐性株がそれぞれ4株、7株、5株、1株認められたのに対して、*A. baumannii* 以外のアシネトバクター属菌では6剤耐性株が1株 (*A. nosocomialis*) 認められたが5剤、7剤、8剤耐性株は認められなかった。感染症法に定める多剤耐性アシネトバクター (MDRA) の届出基準を満たす IPM、AMK、CPFX 耐性を獲得した株は認められなかったが、AMK と CPFX 耐性を示す株が9株認められ、これらは全て6剤以上耐性の *A. baumannii* であった。血液由来株では AZT、PIPC 耐性株が1株、AZT 耐性株が1株、感受性株が5株 *A. baumannii* 1株を含む) であった。

### 3. *Acinetobacter baumannii* の ST 型

表3に *Acinetobacter baumannii* の Sequence type (ST 型) を示す。European clone II に相当する ST2 の株が5株と最も多く、次



いでST33およびその近縁株の株が3株と続いた。

#### D. 考察

医療機関、民間検査機関ではアシネトバクター属菌の菌種同定が困難であることから、国内におけるアシネトバクター属菌の分離状況に関する知見は乏しい。今回、我々は秋田県と愛知県をフィールドとして、医療機関等で分離されたアシネトバクター属菌を収集し、*rpoB* のシークエンス解析により菌種同定を実施した。その結果、秋田県と愛知県で分離株の菌種分布に明瞭な違いがあることが示され、地域に特有の感染疫学が存在している可能性が示唆された。今回データは示さないが、秋田県では分離される主要なアシネトバクター属菌に医療機関により菌種に違いがある傾向も認められた。

愛知県において *A. radioresistens* が多数分離されたが、1病院からのみの報告であり、この病院環境への定着が疑われる。

*rpoB* 遺伝子のシークエンスデータを解析した結果、菌種とシークエンスデータが良好な関連を持つことが示された。また、秋田県および愛知県で分離された *A. baumannii* は全て OXA51 like 遺伝子を保有し、他のアシネトバクター属菌からは見つからなかったことから、この遺伝子が *A. baumannii* のマーカーとして有用であることが確認された。

今回の我々の検討した範囲では IPM 耐性を獲得した株は認められず、感染症法に定める MDRA の届出基準を満たす株は認められなかった。しかしながら、*A. baumannii* には 5 剤以上の薬剤耐性を獲得した株が認められ、このような耐性 *A. baumannii* は医療現場や院内感染原因菌として問題になるものと考えられる。*A. baumannii* 以外のアシネトバクター属菌は、*A. baumannii* と比較して薬剤耐性株は少な

かった。

MLST 解析の結果から愛知県には耐性傾向が強いといわれる European clone II がすでに定着していることが示唆された。秋田県で分離された株の MLST 解析データはないが、耐性度の高い分離株も存在することから European clone II が存在する可能性がある。秋田県分離株の MLST 解析を進める必要がある。

重篤な感染症に至る可能性が高い、血液感染を惹起した 7 株中、6 株が *A. nosocomialis* であったのに対して、*A. baumannii* は 1 株のみであった。*A. nosocomialis* がアシネトバクター属菌の中で血液感染を惹起する可能性が高いのかどうか、今後もさらに検討を続ける必要がある。

#### E. 結論

*rpoB* 遺伝子の解析はアシネトバクター属菌の同定に有用である。今回、秋田県と愛知県で検討した範囲では感染症法に定める MDRA は検出されなかったが、5 剤以上の薬剤に耐性を獲得した *A. baumannii* が検出され、これらの菌は医療機関において院内感染原因菌などとして問題になる可能性が高い。重篤な感染症に発展する可能性が高い、アシネトバクター属菌による血液感染の発生状況について、今後もデータを集積する必要がある。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 アシネトバクター分離株の菌種 (株数)

菌種	秋田県	愛知県
<i>Acinetobacter baumannii</i>	68	25
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	34	40
<i>Acinetobacter pittii</i>	22	4
<i>Acinetobacter sp. Close to 13TU</i>	13	6
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	6	0
<i>Acinetobacter oleivorans</i>	2	0
<i>Acinetobacter ursingii</i>	2	2
<i>Acinetobacter soli</i>	1	2
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	0	24
合計	148	103

表2 アシネトバクター分離株の由来 (秋田県)

由来	株数
喀痰	69
尿	20
咽頭	11
皮膚	9
膿	7
血液	7
その他	25
計	148

表3 *Acinetobacter baumannii* の ST 型

菌株番号	ST (Pasteur)	
2007N424	ST2	2-2-2-2-2-2-2
2011N461	ST2	2-2-2-2-2-2-2
2011N465	ST2	2-2-2-2-2-2-2
2011N468	ST2	2-2-2-2-2-2-2
2011H01-1	ST2	2-2-2-2-2-2-2
2004N412	ST33	3-5-7-1-7-1-4
2008N496	ST33	3-5-7-1-7-1-4
2008AJ001	new	3-3-7-1-7-1-4
2007N358	ST34	8-1-14-3-12-1-13
2006N424	ST152	8-1-5-3-6-2-3
2002N303	new	3-4-2-2-7-2-2
2006N422	new	27-1-7-1-7-1-2
2007AJ001	new	27-(2) <sup>#</sup> -(2) <sup>#</sup> -1-9-2-5

#該当する配列がデータベースに登録されていないため最も近い配列番号を記載

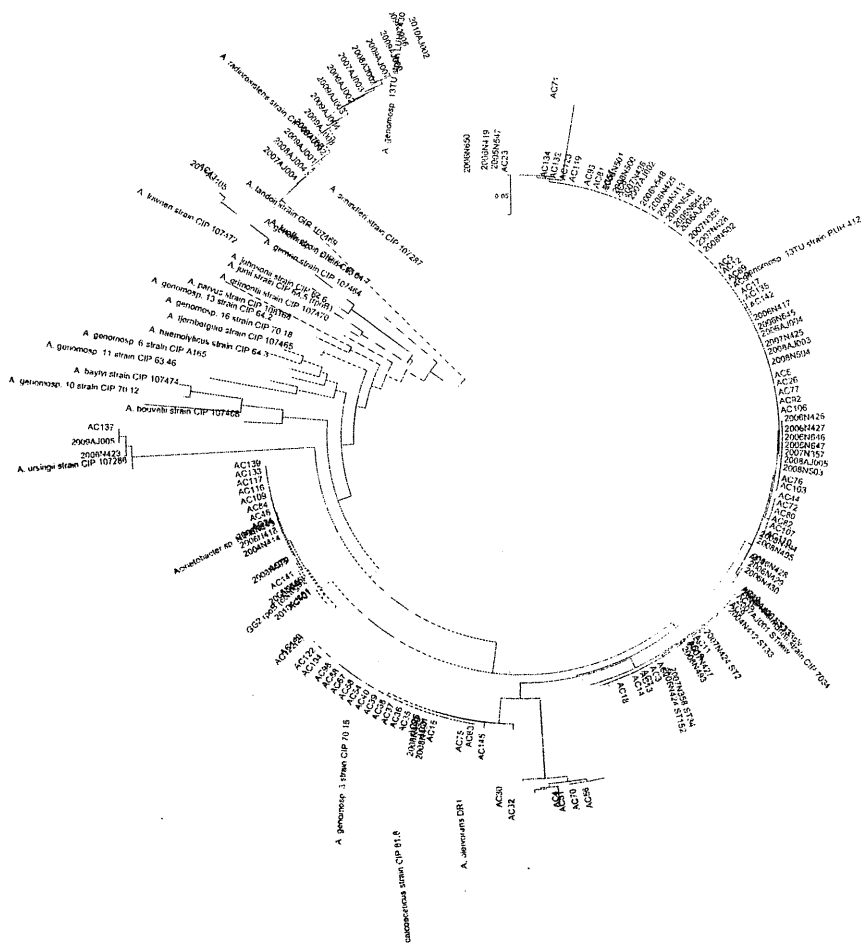


図1 *rpoB* 遺伝子配列によるアシネトバクター属菌の同定

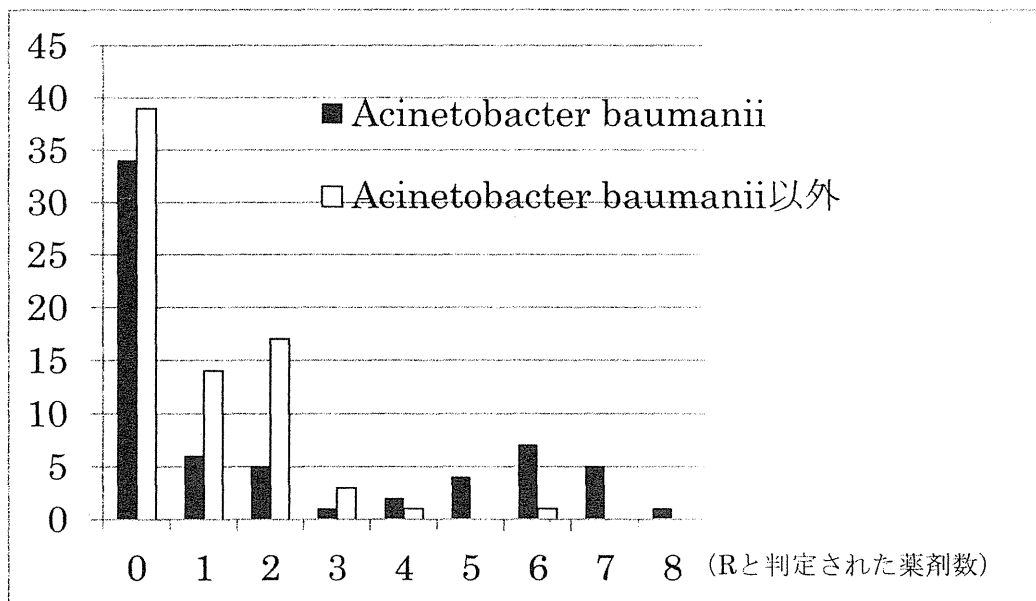


図2 アシネトバクター分離株の薬剤感受性  
 (横軸：KB法によりRと判定された薬剤の数、縦軸：株数)