

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

新型の薬剤耐性菌の構造と立体構造に立脚した検出剤の分子設計
並びに迅速・簡便検査法の確立

研究分担者 黒崎 博雅 （熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授）
研究協力者 山口 佳宏 （熊本大学・環境安全センター・准教授）

研究要旨

本研究では *Serratia marcescens* 由来のメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の結晶化を行い、2.0Åの分解能でX線結晶構造解析を行った。IMP-1 の活性中心には、結晶化溶液由来のクエン酸1分子が存在しており、分子中にある3つのカルボキシル基のうち2つカルボキシル基と水酸基の酸素原子が2つの Zn(II) イオン (Zn1 と Zn2) に結合していた。さらに Zn(II) イオンへの結合に関与しているカルボキシル基は活性中心近傍にある基質の認識に重要であると考えられている Lys224 と Asn233 に水素結合していることが分かった。残り1つのカルボキシル基はどのアミノ酸残基とも相互作用しておらず、フリーの状態にあった。2000年に Concha らが報告した *Pseudomonas aeruginosa* 由来の IMP-1 の結晶構造を報告しているが、活性中心構造は異なっていることが分かった。すなわち Zn1 と Zn2 の配位構造は Concha らの構造では4配位-4配位構造であるのに対し、我々の構造では5配位-6配位構造をとっていた。

クエン酸が結合した IMP-1 の結晶構造を基にして、新たにクエン酸モノベンジルエステルを合成し、IMP-1 に対する阻害活性を検討した。その結果、クエン酸モノベンジルエステルの濃度 500 μM において IMP-1 の酵素活性を約 50% 阻害することが分かった。

今回明らかにしたクエン酸-IMP-1 複合体構造は、新たな阻害様式に基づいたメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤を分子設計する上で重要な知見を与えるものと考えている。

A. 研究目的

NDM-1 (New Delhi Metallo-β-lactamase) は 2009 年にインドから帰国したスウェーデン人からはじめて分離された。これまでのメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) は、緑膿菌など日和見細菌から殆ど産生されていたのに対して、NDM-1 は大腸菌や肺炎桿菌から分離され、市中感染して世界的に蔓延することが危惧されている。MBL は、活性中心に Zn(II) イオンを含有し、ペニシリンからカルバペネムまでほぼ全ての β-ラクタム剤を分解する。現在臨床使用されているクラブラン酸やスルバクタムなどのセリン-β-ラクタマーゼ阻害剤に対して全く感受性を示さず、臨床効果的な阻害剤がない。さらに今回の新たな NDM-1 出現もあり、薬剤耐性の化学反応機構の詳細や阻害剤開発

など分子科学からの研究が待たれている。

我々は、メタロ-β-ラクタマーゼの X 線結晶構造に基づき、MBL 阻害剤の開発を行っている。本研究では、メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の活性中心にクエン酸が結合した結晶構造を決定し、この構造を基にクエン酸誘導体の分子設計と合成を行い、IMP-1 に対する阻害活性を評価した。

B. 研究方法

(1) IMP-1 の発現と精製

IMP-1 は、既に報告された方法に従って、大腸菌 BL21(DE3) で発現させ、イオンカラムクロマトグラフィーとゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって精製した⁽¹⁾。8 L の培養液から、約 100 mg の IMP-1 を精製することができた。純度は、SDS-PAGE によって確認した。

(2) IMP-1 の結晶化

IMP-1 の結晶は、既に報告された方法に従って行った⁽²⁾。具体的には、60 mg/mL の IMP-1 (20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5) を蛋白質溶液とし、0.2 M 酢酸ナトリウム、PEG4000 (30% w/v) を含む 0.1 M クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) をリザーバ溶液として IMP-1 の結晶化を蒸気拡散法によって 20°C で行った。約2週間後に 0.2 mm×0.2 mm×0.1 mm の大きさの IMP-1 の結晶が析出した。

(3) IMP-1 の構造解析

IMP-1 の結晶は、高エネルギー加速器研究機構にある Photon Factory (PF) の BL-5A において、クライオプロテクタントなしで 100K で、X 線回折データを収集した。X 線回折データは、HKL2000 を使って解析した。

IMP-1 の構造解析は、既に報告されている IMP-1 の構造データ (PDB code; 1DD6) を使って、分子置換法で行った。分子置換法は、CCP4 ソフトウェアパッケージにある MolRep プログラムを使い、精密化は REFMAC プログラムを使った。モデリングは Coot によって行った。

(4) クエン酸モノベンジルエステルの合成

クエン酸 (無水) (15 g, 78 mmol)、ベンジルアルコール (21 g, 196 mmol)、ホウ酸 (0.5 g, 8 mmol) を混合し、室温で 4 日攪拌した。反応液に酢酸エチルエステル 100 mL と水 100 mL を加え攪拌しながら 10% NaOH 水溶液で pH 8 に調整した。分液ロートで酢酸エチルエステル層と水層を分離した後、水層を 1 M HCl 水溶液で pH 1 に調整した。塩化メチレン 100 mL で抽出操作を行い、塩化メチレン層を分離し、Na₂SO₄ (無水) で乾燥・ろ過し、ろ液をエバポレーターで濃縮すると油状物質が得られた。これに塩化メチレン-*n*-ヘキサン溶液を加え室温で 2 日間放置すると白色のクエン酸モノベンジルエステルが固体として得られた (収量, 5 g)。

化合物の同定は ¹H NMR スペクトル (300 Hz, CDCl₃, TMS: δ = 12.0-9.5 (s, 1-2H), 7.42-7.30 (m, 5H), 5.14 (s, 2H),

3.06-2.87 (m, 4H) ppm) を測定して行った。得られた ¹H NMR スペクトルはクエン酸モノベンジルエステルの化学構造を支持した。

(5) 加水分解測定

酵素活性の評価は、分光光度法によって行った。0.3 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 (Tris-Buffer) 3.0 mL に酵素の最終濃度が 1 nM となるように 310 nM の IMP-1 溶液を 10 μL 加え、30°C で 5 分間インキュベートした。その後、基質の最終濃度が 100 μM となるように 3.1 mM セファロチン水溶液を 100 μL 加え、すばやく混合し、297 nm の吸収を 3 分間測定した。直線的な吸光度の減少から初速度を求めた。

(6) クエン酸モノベンジルエステルによる IMP-1 阻害の検討

(5) の酵素活性評価と同様に行った。具体的には、Tris-Buffer 2.9 mL に、所定の濃度となるようにメタノールで調製したクエン酸モノベンジルエステル溶液 100 μL と酵素の最終濃度が 1 nM となるように 310 nM の IMP-1 溶液を 10 μL 加え、30°C で 5 分間インキュベートした。その後、基質であるセファロチンを加え、297 nm の吸収を 3 分間測定した。直線的な吸光度の減少から初速度を求めた。

得られた初速度 (1 分間当たりの傾き) とクエン酸モノベンジルエステル未添加の時の初速度を比較した。

C. 研究結果

(1) クエン酸-IMP-1 複合体の結晶構造

IMP-1 の結晶構造は、分解能 2.0 Å で解析され、空間群 *P*1、結晶格子 $a = 49.9$, $b = 75.7$, $c = 82.3$, $\alpha = 83.5$, $\beta = 75.4$, $\gamma = 74.1$ であった。非対称単位に IMP-1 分子が 4 分子あった。IMP-1 の活性中心には、2 つの Zn(II) イオン (Zn1 と Zn2) と 1 つのクエン酸の電子密度を観察することができた (図 2)。精密化とモデリングによって、 $R_{\text{working}} = 0.210$, $R_{\text{free}} = 0.263$ まで解析した。現在、更に精密化を行っている。

(2) クエン酸の結合様式

クエン酸は、3つのカルボキシル基と1つの水酸基をもつ分子量 192 の化合物である。クエン酸の水酸基は Zn2 に結合していた。1つ目のカルボキシル基の一方の酸素原子は、Zn1 と Zn2 を架橋して結合しており、もう一方の酸素原子は、Zn1 と Asn233 側鎖の窒素原子に結合していた。2つ目のカルボキシル基の一方の酸素原子は、Zn2 と Lys224 側鎖の窒素原子と結合しており、もう一方の酸素原子は Asn233 の主鎖窒素原子に結合していた。3つ目のカルボキシル基は、フリーの状態であった(図 3,4)。

(3) クエン酸モノベンジルエステルの合成

今回明らかにしたクエン酸-IMP-1 複合体構造を基に、1つのクエン酸誘導体を分子設計した。クエン酸の1つのカルボキシル基はフリーの状態にあり(前述)、このカルボキシル基を化学修飾すれば未置換のクエン酸分子に比べ、より IMP-1 に強く結合すると考えた。そこで、クエン酸モノベンジルエステル(図 5)を合成し、IMP-1 に対する阻害活性を評価した。

クエン酸モノベンジルエステルは、ホウ酸(触媒)存在下、クエン酸とベンジルベンジルアルコールを室温で4日反応させた後、抽出操作を行うことで、1段階で合成できた。

(4) クエン酸モノベンジルエステルによる IMP-1 阻害の検討

IMP-1 の結晶構造では、活性中心にクエン酸が結合していることが分かった。そこでクエン酸を阻害剤として、IMP-1 のセファロチン加水分解反応溶液中に1 mM となるように加えて IMP-1 に対する阻害活性を調べた。その結果、1 mM のクエン酸が IMP-1 反応溶液中に存在しても、IMP-1 活性は阻害されないことが分かった。このことから、IMP-1 のクエン酸に対する 50% inhibitory concentration (IC_{50}) 値は1 mM 以上であることが推定される。

次に、クエン酸モノベンジルエステルを阻害剤として、IMP-1 のセファロチン加水分解反応溶液に1 mM となるように加え、その阻害活性

を調べた。その結果、クエン酸の時とは違い、IMP-1 の加水分解速度が約70%低下することが分かった(図 6)。そこでクエン酸モノベンジルエステルが500 μ M となるように加えたところ、阻害剤を加えない時の IMP-1 活性より約50%低下することが分かった(図 6)。クエン酸モノベンジルエステルが100 μ M では IMP-1 活性が15%低下した(図 6)。このことから、クエン酸モノベンジルエステルの IMP-1 に対する阻害活性 IC_{50} 値は約500 μ M であることが分かった。

D. 考察

IMP-1 の全体構造は $\alpha\beta/\beta\alpha$ サンドイッチ構造をとっており、その β -シート間の広くて浅い溝の底に活性中心が存在していた(図1)。さらに活性中心には、クエン酸が1分子結合していた(図2, 3)。このクエン酸は IMP-1 を結晶化するときのリザーバ溶液由来であることが想定できた。2000年に Concha らは IMP-1 の結晶構造を報告されている⁽²⁾。我々は Concha らの結晶化条件に従い結晶化を行った。しかし、Concha らの IMP-1 の活性中心にクエン酸は見られなかった。この原因として今回の分解能は2.0Åであり、Concha らは3.1Åであったことから、結晶構造のデータが改善され、今まで見えなかったクエン酸が観察できるようになったと考えられる。

また IMP-1 に対するクエン酸の結合様式において(図 3,4)、3つあるクエン酸のカルボキシル基のうち、1つのカルボキシル基は、どのアミノ酸残基と結合していないフリーの状態であった。そこで、このカルボキシル基にベンゼン環を導入したクエン酸モノベンジルエステルを合成して、IMP-1 に対する阻害活性の向上を目指した。IMP-1 に対する阻害活性の検討において、クエン酸では IC_{50} 値が1 mM 以上であったが、クエン酸モノベンジルエステルでは、約500 μ M と阻害活性が向上した。

MOE(統合計算化学システム)による IMP-1 とクエン酸モノベンジルエステルのドッキングシミュレーションの結果から、2つの Zn(II) イオンへのクエン酸モノベンジルエステル結合様式は結晶構造の結合様式とほぼ同一であった。さらに新たに導入したベンジルエステル部位は、IMP-1 活性ポケットの疎水性

空間を埋めるように基質の認識・取り込みに重要な働きを担っていると考えられている Trp64 の方向へ向かっていた。この疎水性相互作用によってクエン酸よりもより強く IMP-1 に結合し、その結果として IMP-1 に対する阻害活性が高くなったものと考えられる。このことから、クエン酸をリード化合物とした IMP-1 に対する阻害剤開発が行えることが分かった。

E. 結論

今後は分子構造の最適化を図り、IMP-1 酵素阻害活性が強い化合物の探索を行っていく予定である。さらに、 β -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い、野生型と変異型メタロ- β -ラクタマーゼの遷移状態における活性化自由エネルギーを算出し、 β -ラクタム剤とメタロ- β -ラクタマーゼの加水分解反応機構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

なし

2. 学会発表

(1) クエン酸-メタロ- β -ラクタマーゼ

(IMP-1)複合体の結晶構造

山口佳宏、荒川宜親、黒崎博雅

第42回薬剤耐性菌研究会

(2013/10/17-18, 熱海)

(2) IMP-2 メタロ- β -ラクタマーゼの結晶化

とX線結晶構造解析

山口佳宏、黒崎博雅

第25回日本臨床微生物学会総

(2014/2/1-2, 名古屋)

(3) メタロ- β -ラクタマーゼ(IMP-1)の活性

中心に結合したクエン酸の結合様式

山口佳宏、荒川宜親、黒崎博雅

日本薬学会第134年(発表予定)

(2014/03/27-30, 熊本)

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) W. Jin, Y. Arakawa, H. Yasuzawa, T. Taki, R. Hashiguchi, K. Mitsutani, A. Shoga, Y. Yamaguchi, H. Kurosaki, N. Shibata, M. Ohta, M. Goto, Biol. Pharm. Bull., 27(6), 851-856 (2004)
- (2) N. O. Concha, C. A. Janson, P. Rowling, S. Pearson, C. A. Cheever, B. P. Clarke, C. Lewis, M. Galleni, J.-M. Frère, D. J. Payne, J. H. Bateson, S. S. Adbel-Meguid, Biochemistry, 39(15), 4288-4298 (2000)

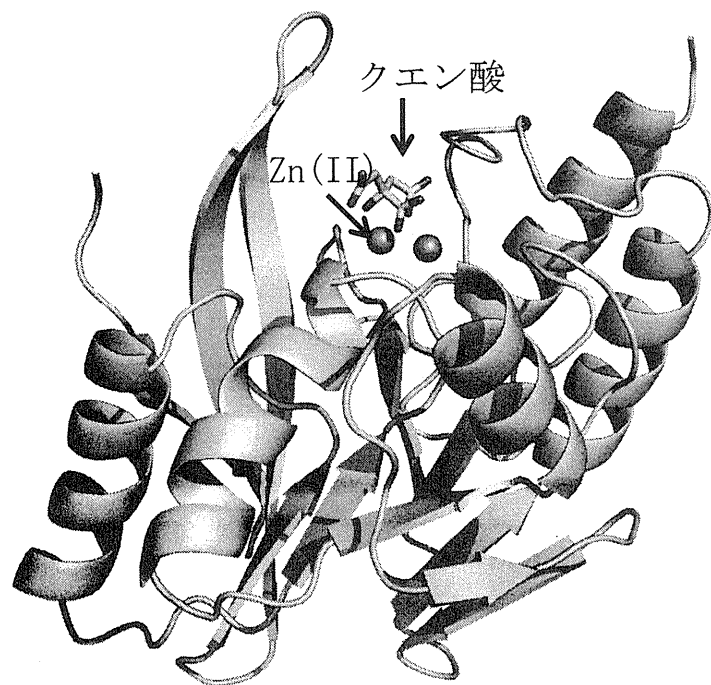


図1.クエン酸-IMP-1複合体の全体構造

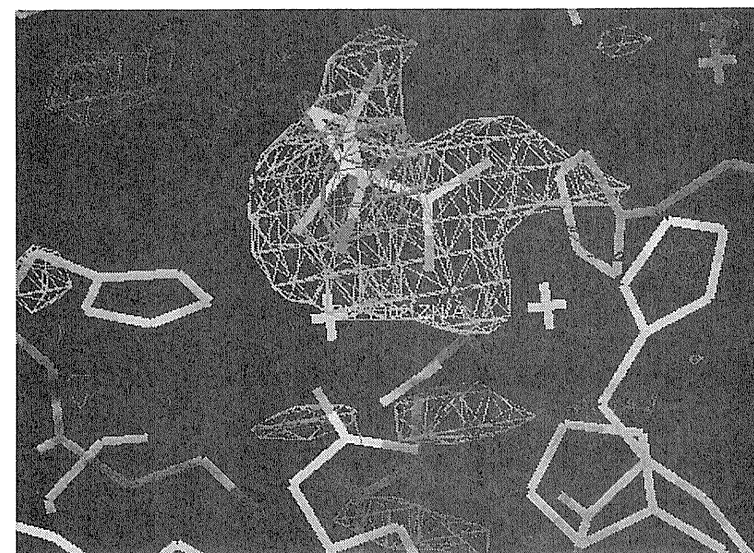


図2. 活性中心構造. 緑は $|F_o| - |F_c| 3\delta$ の電子密度マップ

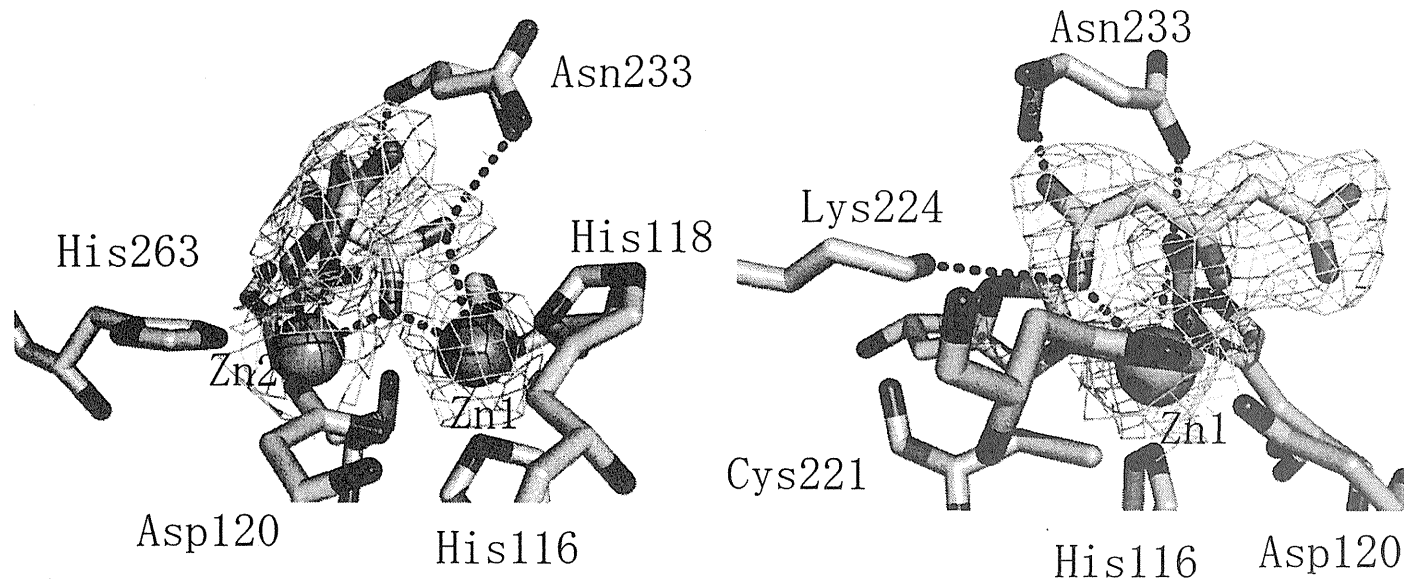


図3. 活性中心に結合するクエン酸配位構造. クエン酸がIMP-1の活性中心にきちんとはまっていることが、電子密度から分かった. クエン酸の1つのカルボキシル基はフリーであった. Zn1は5配位、Zn2は6配位であることが分かった.

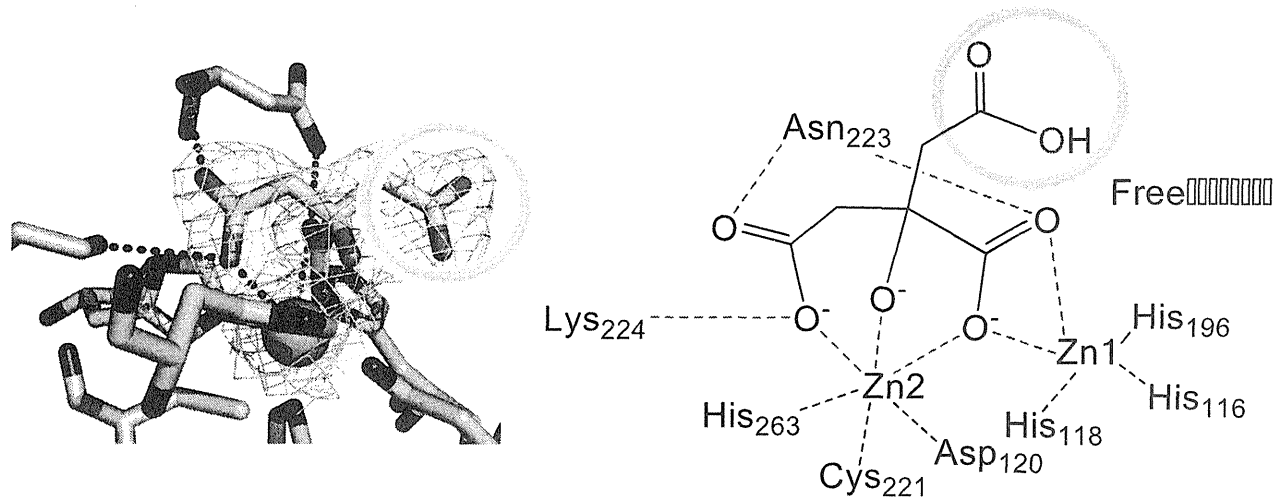


図4. IMP-1-クエン酸結合の模式図

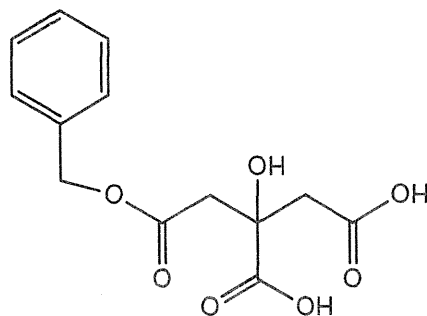


図5. クエン酸モノベンジルエステル

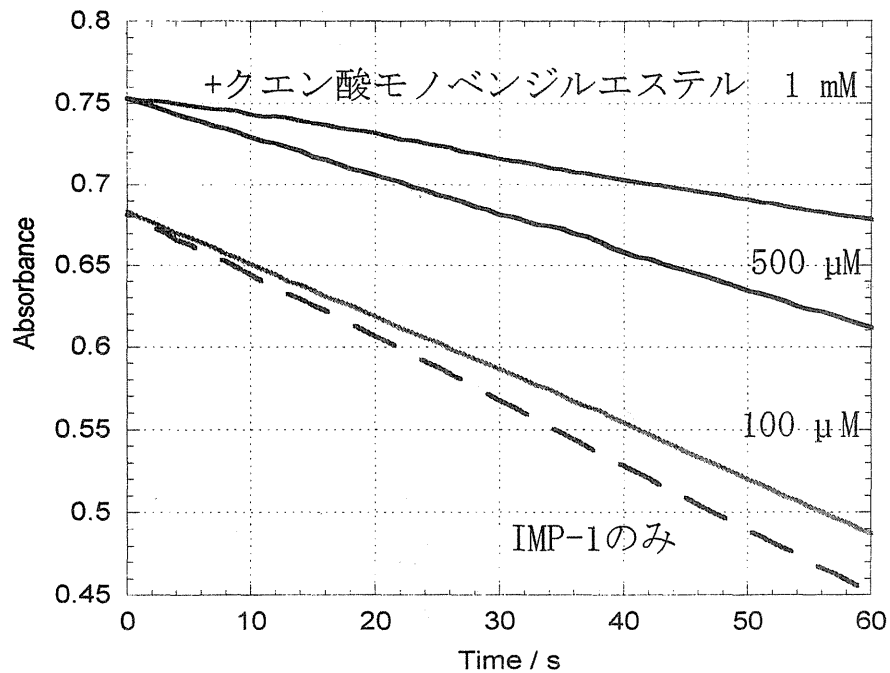


図6. IMP-1によるセファロチン加水分解反応における吸光度(290 nm)の時間変化

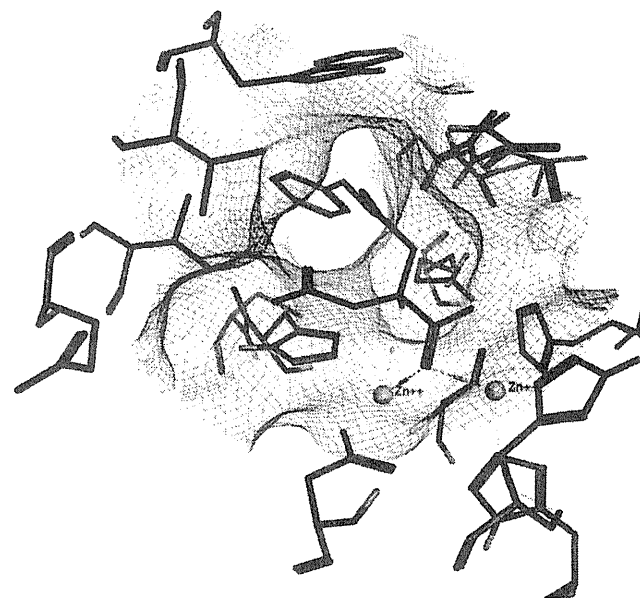


図7. MOEによるクエン酸モノベンジルエステルとIMP-1とのドッキングシュミレーション

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
「アシネトバクター属菌の鑑別法に関する研究」

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 calcoaceticus-baumannii complex* を構成する 4 つの *genospecies* (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*) を迅速に鑑別する遺伝子検査法を検討した。昨年度は、*gyrB* 遺伝子をターゲットとしたが、今年度は *rpoB* 遺伝子を対象とした MultiplexPCR 法を考案し、その鑑別能力を検討した。その結果、*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* を鑑別することが可能であった。また、*A. calcoaceticus* については検討の余地が残されている結果となったが、今年度医療機関から分離された 69 株の *Acinetobacter* 属菌の鑑別を行い評価したところ、*rpoB* 遺伝子配列の同定結果と本法の一致度は 97% であり、ほぼ、実用レベルの鑑別法として使用できると考えられた。今後は、さらに医療機関から分離される *Acinetobacter* 属菌の鑑別法として評価するとともに、地方衛生研究所における利用について検討したい。

A. 研究目的

地方衛生研究所（地研）は、公衆衛生領域で発生する様々な健康危機事例に際し、検査を通じて科学的エビデンスを提供し、健康危機事例の早期探知や拡大防止に資することを目的の一つとする。従って、近年問題となりつつある医療関連機関における薬剤耐性菌の広がりに対して、地研の役割が期待されるなかで、検査機能の強化が望まれている。

アシネトバクター属菌は、ブドウ糖非発酵グラム陰性短桿菌で、ヒトに病原性を示す菌種としては *Acinetobacter baumannii* がよく知られている。さらに、ヒトに対して感染症を起こす可能性がある *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter genospecies 13TU* (*A. nosocomialis*), *Acinetobacter genospecies 3* (*A. pittii*) とは、ほぼ同様な生化学的性状を示すため、医療機関等で汎用されている自動同定機器や一般の検査法では正しく鑑別することは難しく、そのため *A. calcoaceticus-baumannii complex* (ACBC) と呼ばれている。さらに、アシネトバクター属菌の高い形質転換能をもち外来遺伝子を取り込むシステムを有していることに関連して、*A. baumannii* の多剤耐性化と医療機関でしばしば検出される *A. nosocomialis* や *A. pittii* との関連性など不明な点が多いのも事実である。アシネトバクター属菌は、医療機関内で院内感染や日和見感染

を起こすことが知られており、特に *A. baumannii*、多剤耐性化しやすく、しばしば集団発生による死亡例も報告されている。このような状況下で 2011 年 1 月、薬剤耐性アシネトバクターは感染症法の 5 類感染症に追加され、報告基準が設けられた。従って、*A. baumannii* の院内対策をするうえで、アシネトバクター属菌の分離状況を把握することは重要である。それには、ACBC 構成菌種を簡便に鑑別する方法が必要である。

アシネトバクター属菌は、DNA-DNA 分子交雑法で区別された遺伝子型 (*genospecies*) で歴史的には分類されており、ACBC は生化学的性状での鑑別が難しいため、遺伝子型による簡便な鑑別法が利用されている。例えば *bla_{OXA51-like}* を検出するアシネトバクター属菌は、*A. baumannii* とほぼ判定できる。しかし、この方法は極めて簡便ではあるが、細菌の鑑別法としての意味づけは不明である。また、16SrRNA 配列による分類も DNA-DNA 分子交雑法による分類には及ばず、極めて近縁な細菌の鑑別法として、蛋白質をコードしている遺伝子配列の多型を利用した鑑別法が開発されており、その対象遺伝子は、*recA*, *gyrB*, *rpoB* などがよく利用される。

本研究では、ACBC を構成する上記 4 つの菌種を迅速に鑑別することを可能にする PCR ベースの方法を開発することを目的とし、昨年度は *gyrB*

配列を対象とした。今年度はよりアシネトバクター属菌の鑑別に有効であるとされる *rpoB* の配列多型を複数のプライマーで検出する Multiplex PCR 法を考案し、評価したので報告する。

B. 研究方法

B-1 供試菌株および供試 DNA

臨床分離 *A. baumannii* 8 株 (Ab1~8) は、感染症研究所から分与を受けた。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、詳細は昨年度報告書参照) の一部を用いた。

Acinetobacter 属菌の陽性コントロールとして、感染症研究所から分与された *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, 及び *A. calcoaceticus* 由来のゲノム DNA を用いた。

また、富山県の医療機関のうち、細菌検査室を持つ 6 つの施設から *Acinetobacter* 属菌として分離された 69 株 (AcT001~069) を用いた。

B-2. 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 μ 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、遠心上清を分取し、TE 緩衝液を用いて 50ng/ μ L 濃度に希釈し、PCR の鋳型とした。保管は、凍結保管とした。

B-3. 感受性試験

富山県の医療機関で分離されたアシネトバクター属菌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、判定はディスクの判定法に従った。使用した 12 ディスクは以下の通りである: 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)。

B-4. PCR と DNA sequencing

供試菌株から抽出した DNA を用いた PCR は、*bla*_{OXA51-like}, *bla*_{OXA23-like} 及び *integron* マーカーである *integrase* 遺伝子を検出するプライマーを用いて

実施した (表 1)。PCR は、QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Inc.) を用いて、増幅産物は、1.5% アガロース S (ニッポンジーン) で電気泳動し、臭化エチジウムで染色、脱色後、写真撮影した。

ACBC 鑑別 PCR は、KODFX (Toyobo) を使用した。増幅産物の検出は、2% NuSieve@3:1 Agarose (Takara) で電気泳動し、臭化エチジウムで染色、脱色後、写真撮影した。

rpoB の部分配列決定は、La Scola らの報告 (J.Clin.Microbiol., 44:827-832, 2006) を参照して、*rpoB* 内の Zone1 及び Zone2 の配列解析を行った。配列決定用の鋳型調製は、プライマー Ac696F、Ac1598R にて、PCR 後、増幅物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、これを鋳型として、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit Ver3.1 で、プライマー Ac696F, Ac1598R, Ac1093R 及び Ac1055F を用いて、サイクルシーケンシング反応を行い、Sephadex-G50 ゲル濾過液を ABI 3130xl Genetic Analyzer を用いて解析した。得られたデータは、Sequencher[®] で塩基配列の品質チェック、トリミング後、Web ベースの Blast 検索を実施し、菌種を推定し、*rpoB* 塩基配列による鑑別結果とした。

(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. calcoaceticus-baumannii* complex (ACBC) 鑑別のための Multiplex PCR 用プライマーの設計と PCR 条件

昨年度は、*gyrB* 遺伝子をターゲットとして、Line PCR 法により、菌種同定が可能となるか検討し、完全には ACBC の鑑別を行うことは難しいことを報告した。今年度は *rpoB* 遺伝子をターゲットとして、プライマーの設計を行った (図 1)。La Scala, B ら (J.Clin.Microbiol., 44:829, 2006) の論文に記載されている *rpoB* 遺伝子の Zone1 と Zone2 をほぼカバーする 861bp を含む、*A. baumannii* 由来 26、*A. calcoaceticus* 由来 13、*A. nosocomialis* 由来 19、及び *A. pittii* 由来 21 配列を公的 DNA バンクから得た。これらの配列から、ACBC の構成各菌種を PCR で区別可能か検討したが、いずれも種特異的な 4 つのプライマーの設計は困難であった。そこで、この 861bp の配列中、4 種のアシネトバ

クター属菌を鑑別可能とするためのプライマー結合部位を検索した。4種に共通、*A. baumannii* と *A. nosocomialis* に共通、*A. calcoaceticus* と *A. pittii* に共通、あるいは種特異的な鑑別プライマーの結合部位として、領域1～5（図1の *rpoB*-1～5と表示、ただし、*rpoB*-1,4は省略、また、*rpoB*-45は、*rpoB*-4と5の間の部位であることを示している）を選択し、いくつかの組合せで、種特異的な Multiplex PCR の泳動パターンが得られるかを検討した。最終的に、2つの反応チューブを用いる Multiplex PCR で、*A. baumannii* と *A. nosocomialis* を主に鑑別する PCR-A と *A. calcoaceticus* と *A. pittii* を鑑別する PCR-B として設計した。また、今回反応は2反応として実施するため、2つの反応を泳動後、確認できるようにアシネトバクター属菌を共通に増幅する 16SrRNA 配列を検出し、異なる増幅サイズとなるようにプライマーを新たに設計し、それぞれ加え、前者についての混合プライマーMC-6、後者については混合プライマーMD-6を構築した（表1）。このPCRの条件は、以下の通り実施した。

鋳型 DNA 溶液	2μL
混合プライマー	4μL
2mM dNTP	μL
2×KODFX master mix	10μL
KODFX (Toyobo)	0.4μL
Total	(up to) 20μL

サイクル条件
94°C, 2min.
(98°C, 10sec.- 55°C, 30sec.- 68°C, 1min.), 30 cycles
68°C, 2min.

C-2. プライマーの評価

混合プライマーMC-6 (PCR-A) 及びMD-6 (PCR-B) を用いて、ACBC 構成アシネトバクター属菌の標準株DNAと一部臨床分離株を用いて、PCRを実施した（図2）。その結果、PCR-Aで、数本の増幅物が検出されるなかで600bp増幅物が検出された場合には、*A. baumannii*、120bpと700bp増幅物が検出された場合には、*A. nosocomialis*、PCR-Bでは、同じく複数の増幅物が検出されるなかで、120bp付近と700bp増幅物が検出された場合は、*A. pittii*と判定することが可能であることを確認した。ここで、PCR-Bで120bp付近に2バンド検出された。

一方で、*A. calcoaceticus* については、積極的に

鑑別する増幅物が得られなかった。

C-3. 医療機関で分離されたアシネトバクター属菌を用いたPCR鑑別法の評価

今年度、富山県の医療機関に協力を依頼し、アシネトバクター属菌の収集した69株を用いて、MC-6/MD-6混合プライマーを用いたPCRを評価した。供試した69株の薬剤感受性試験、PCRによる遺伝子保有状況、及び*rpoB*配列による菌種の同定結果を示した（表2）。この69株の*rpoB*配列から同定された株の分離頻度は、*A. baumannii*, 25/69(36%); *A. nosocomialis*, 12/69 (17%); *A. pittii*, 10/69 (15%); *A. spp.*, 9/69 (13%); *A. soli*, 4/69 (6%); *A. bereziniae*, 2/69 (3%); *A. radioresistens*, 2/69 (3%); *A. grimontii*, 2/69 (3%); *A. calcoaceticus*, 1/69 (1.5%); *A. guillouiae*, 1/69 (1.5%); *A. junii*, 1/69 (1.5%)であった（図3）。

この69株を用いた、MC-6/MD-6を用いたPCRを実施し、その結果は表3に示した。

A. baumannii については、*rpoB*配列結果とPCRの結果は完全に一致した。*A. nosocomialis* については、*rpoB*配列では、12株が*A. nosocomialis*となったが、PCRでは13株であり、1株のみ結果は一致しなかった。また、*rpoB*配列でACBC構成菌種に該当しない場合は、*A. spp.*にカウントしたが、PCRの結果、PCR-Aの反応物に*A. nosocomialis*の鑑別点である120bp増幅物を検出した株が5株存在していた（図4）。従って、*rpoB*配列とPCRの結果の一致率は97%であった。

D. 考察

アシネトバクター属菌、特にACBCを構成する4つの菌種を迅速に鑑別する遺伝子検査法を検討した。昨年度は、*gyrB*遺伝子をターゲットとしたが、今年度は*rpoB*を対象としたMultiplex PCR法を開発し、その型別能力を検討した。

*rpoB*配列によるアシネトバクター属菌の鑑別については、La Scola, Bらは、*rpoB*配列およびRpoB遺伝子の上流と下流のスペーサー領域の配列を用いると鑑別することが可能であることを報告している。ここで彼らの報告している*rpoB*配列中のZone1およびZone2の領域は、鑑別能力が高く、*A. baumannii*のこの領域の配列を抽出してblast検索を行うと、公的データベースに登録されている*rpoB*配列が、*A. baumannii* - *A. nosocomialis* - *A. pittii* - *A. calcoaceticus*のビットスコアの高い順にヒットした。これは、相同性の高さをビットス

コアで換算し、スコアの高い順に並べているが、菌種ごとにクラスターを形成していることがわかる(図5)。従って、この配列により、ほぼACBCを構成菌種が *rpoB* 配列で鑑別できる可能性を示している。しかし、*A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. calcoaceticus* の各クラスター内に、*A. spp* とされる配列が存在すること(図5. 白抜きの配列)、また *A. pittii* クラスター内に *A. calcoaceticus* の配列が存在しており(図5. 矢印で示した配列)、blast 検索に依存するアシネトバクター属菌の同定には注意が必要であることがわかる。以上のような問題点はあるもののACBCの鑑別を迅速に決定する方法の要望は高く、*rpoB* 配列上の種特異的な多型を検出するPCR法の開発を行った。

しかし、鑑別する対象のACBCの構成種は非常に近縁であるので、この4種の菌種を同定する単一のPCRプライマーの設計は困難を極めたので、昨年まで開発してきたLinePCR法の考え方を参考に、ACBCの *rpoB* 配列のZone1およびZone2領域をカバーする領域を対象とした、プライマー効率の差を利用したmultiplex PCR、さらに *A. baumannii*-*A. nosocomialis* と *A. pittii*-*A. calcoaceticus* それぞれの検出能力を高めるため2反応系(PCR-AとPCR-B)として開発した。また、今回のPCR法は、アガロース電気泳動にてその増幅物を検出するため、アシネトバクター属菌特異的な16SrRNAを検出するプライマーを加え、サイズの異なる増幅物が検出できるように添加した、MC-6/MD-6混合プライマーを作製した。

MC-6/MD-6混合プライマーの評価を今年度、富山県の医療機関で分離された69株のアシネトバクター属菌を用いて行った。評価に用いた69株の感受性試験等の検査結果は表2に示した。この69株を用いたPCR鑑別結果を *rpoB* 配列解析と比較したところ、69株中67株は、*rpoB* 結果と一致し(97%)、ACBC構成菌種の鑑別がほぼ可能と思われた(表3)。

ここで一致しなかった2株を見ると、一株(AcT002)は、*rpoB* 配列からACBCには該当しなかったため、*A. spp* としたが、PCRでは *A. nosocomialis* と判定される結果となった(図6)。

しかし、その増幅物を見ると、*rpoB* 配列から *A. nosocomialis* とされた株の120bp増幅物よりも若干大きいこと、700bp増幅物の増幅量が少ないことなど *rpoB* 配列から *A. nosocomialis* とされた株と若干の配列が異なることが推定される。さらにもう一株(AcT037)は、*rpoB* 配列から *A. calcoaceticus* とされたが、この配列は、ゲノム解析株として登録されていたが、図5、7では *A. pittii* の配列に含まれる配列と同一であり、PCRの結果、*A. pittii* と判定されたことと矛盾しない。

以上のように、今回開発したMC-6/MD-6混合プライマーを用いた2反応系を用いることにより、*A. baumannii*, *A. nosocomialis* と *A. pittii* についてはほぼ鑑別ができると思われる。現時点で *A. calcoaceticus* については、評価は終わっていないが、今後、多数の株を検討し、改良を加えることにより、ACBCの構成菌種の鑑別が可能になると思われる。しかし、*A. calcoaceticus* は、それほど医療機関の分離率は高くなく、現時点でも実用的には問題ないと考える。

今回開発したMC-6/MD-6混合プライマーを用いたACBC構成菌種の鑑別法について、今後、実用的評価を行いたい。

E. 結論

ACBC構成アシネトバクター属菌をPCRで鑑別する実用的な方法を開発した。

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。

表 1. プライマーリスト

Primer Name	Sequence, 5' to 3'	Reference
OXA-51-likeF	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	JCM, 44:2974(2006)
OXA-51-likeR	TGGATTGCACTTCATCTTGG	JCM, 44:2974(2006)
OXA-23-likeF	GATCGGATTGGAGAACCAGA	JCM, 44:2974(2006)
OXA-23-likeR	ATTTCTGACCGCATTTCAT	JCM, 44:2974(2006)
Int1F	CAGTGGACATAAGCCTGTTC	JCM, 44:2974(2006)
Int1R	CCCGAGGCATAGACTGTA	JCM, 44:2974(2006)

For *rpoB* sequencing

Ac696F	TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG	JCM, 44:827(2006)
Ac1093R	CMACACCYTTGTTMCCRTGA	JCM, 44:827(2006)
Ac1055F	GTGATAARATGGCBGGTCGT	JCM, 44:827(2006)
Ac1598R	CGBGCRTGCATYTTGTCRT	JCM, 44:827(2006)

For diagnosing ACBC members

Mix	Primer ID	Sequence, 5' to 3'	Target
MC-6 (PCR-A)	#3001f	TAATACCGCATACGTCCTACGG	16SrRNA
	#3007r	TCACCGCGGCATTCTGATCC	16SrRNA
	#2994f	GTGGTTCAACTAAACGTGGTGAT	<i>rpoB</i> -2 site in Fig.1
	#2997f	CAT(C/T)TTATCACCAGGCTGAATAC	<i>rpoB</i> -3 site in Fig.1
	#3005r	GTATTCAGCCTGGTGATAA(G/A)ATG	<i>rpoB</i> -3 site in Fig.1
	#3102nf	ATGAAATCGTRGCACTTTCAGGCAACTT	<i>rpoB</i> -45 site in Fig.1
	#3101br	CAAGTTACCTGCAAGCGCTAGAATTTCT	<i>rpoB</i> -45 site in Fig.1
	#3000r	CTGTACGTGAAATGTCAGCCAAC	<i>rpoB</i> -5 site in Fig.1
MD-6 (PCR-B)	#3001f	TAATACCGCATACGTCCTACGG	16SrRNA
	#3006r	GTATGTCAAGGCCAGGTAAGG	16SrRNA
	#2995f	GGTTCGACTAAACGTGGCGAC	<i>rpoB</i> -2 site in Fig.1
	#2997f	CAT(C/T)TTATCACCAGGCTGAATAC	<i>rpoB</i> -3 site in Fig.1
	#3005r	GTATTCAGCCTGGTGATAA(G/A)ATG	<i>rpoB</i> -3 site in Fig.1
	#3104pcf	CTGAAGTCTTRGCACTTTCAGGCAAYTT	<i>rpoB</i> -45 site in Fig.1
	#3105pcr	TAARTTGCCTGAAAGTGCYAAGACTTCAG	<i>rpoB</i> -45 site in Fig.1
	#2999r	GAGAGATACCAGCTAACTCAAGC	<i>rpoB</i> -5 site in Fig.1

表2. 医療機関から分離されたアシネトバクター属菌69株の検査結果

Strains	CTX	CAZ	IPM	MEPM	AZT	CFPM	PIPC	AMK	CPFX	MINO	CL	G	PCR			<i>rpo B</i> sequencing
													OXA51	OXA23	Int	
AcT001	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT002	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.spp</i>
AcT003	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT004	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT005	I	R	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT006	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.berezinae</i>
AcT007	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.grimontii</i>
AcT008	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.soli</i>
AcT009	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT010	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT011	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT012	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.spp</i>
AcT013	I	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.soli</i>
AcT014	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.spp</i>
AcT015	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT016	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT017	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT018	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT019	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT020	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.spp</i>
AcT021	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.berezinae</i>
AcT022	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.spp</i>
AcT023	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT024	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT025	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT026	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT027	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT028	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT029	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.junii</i>
AcT030	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.guillouiae</i>
AcT031	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT032	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT033	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT034	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT035	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.spp</i>
AcT036	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.soli</i>
AcT037	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.calcoaceticus</i>
AcT038	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	+	-	<i>A.radioresistens</i>
AcT039	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	+	-	<i>A.radioresistens</i>
AcT040	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT041	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT042	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.spp</i>
AcT043	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT044	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT045	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT046	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT047	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT048	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT049	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT050	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT051	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT052	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.spp</i>
AcT053	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT054	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT055	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT056	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT057	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT058	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT059	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT060	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT061	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.pittii</i>
AcT062	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT063	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.grimontii</i>
AcT064	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT065	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>
AcT066	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.nosocomialis</i>
AcT067	I	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.spp</i>
AcT068	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	<i>A.soli</i>
AcT069	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	<i>A.baumannii</i>

表3. *rpoB* PCRによる鑑別法の評価

		Evaluation by <i>rpoB</i> PCR					Total
		<i>bau.</i>	<i>noso.</i>	<i>pittii</i>	<i>cal.</i>	spp.	
Evaluation by <i>rpoB</i> sequencing	<i>bau.</i>	25					25
	<i>noso.</i>		12				12
	<i>pittii</i>			9			9
	<i>cal.</i>			1			1
	spp.		1			21	22
Total		25	13	10	0	21	69

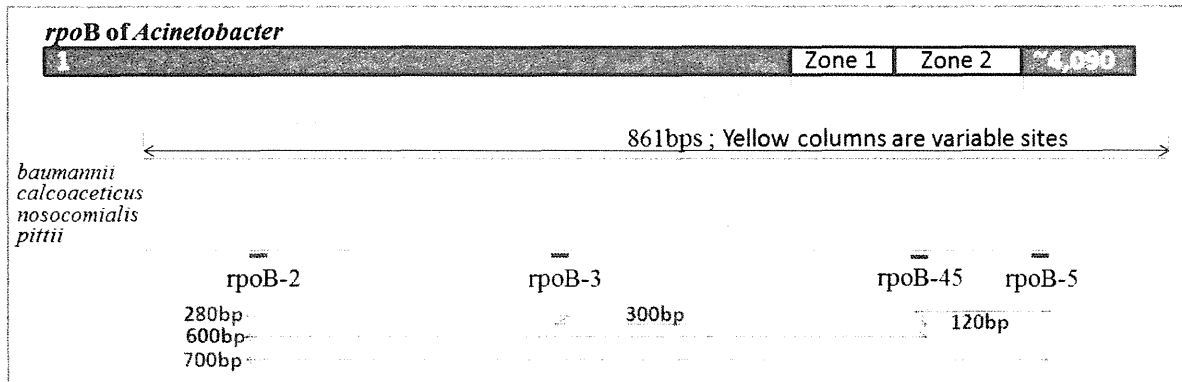


図1. *rpoB* をターゲットとした鑑別 PCR のプライマー結合部位

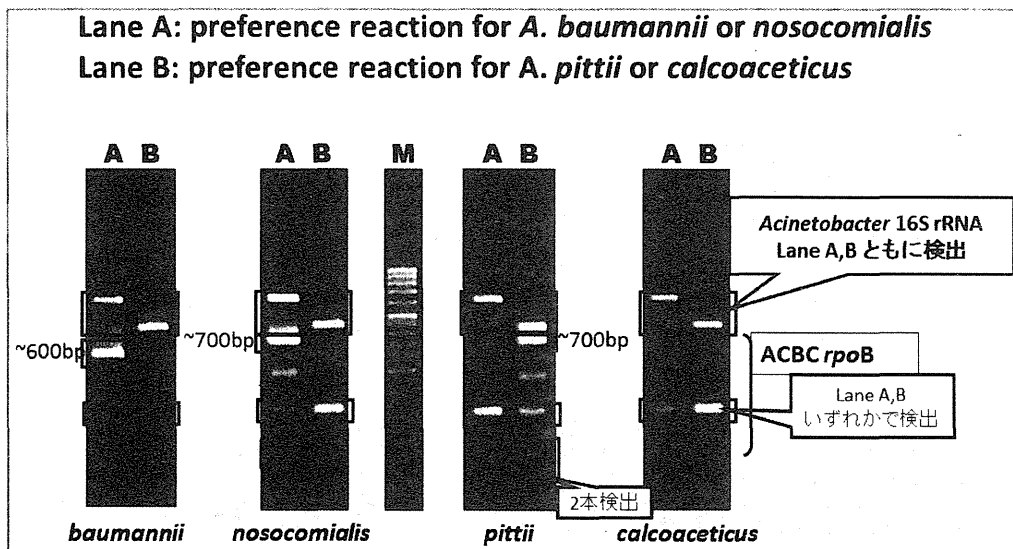


図2. *rpoB* ターゲットとした鑑別 PCR の鑑別パターン

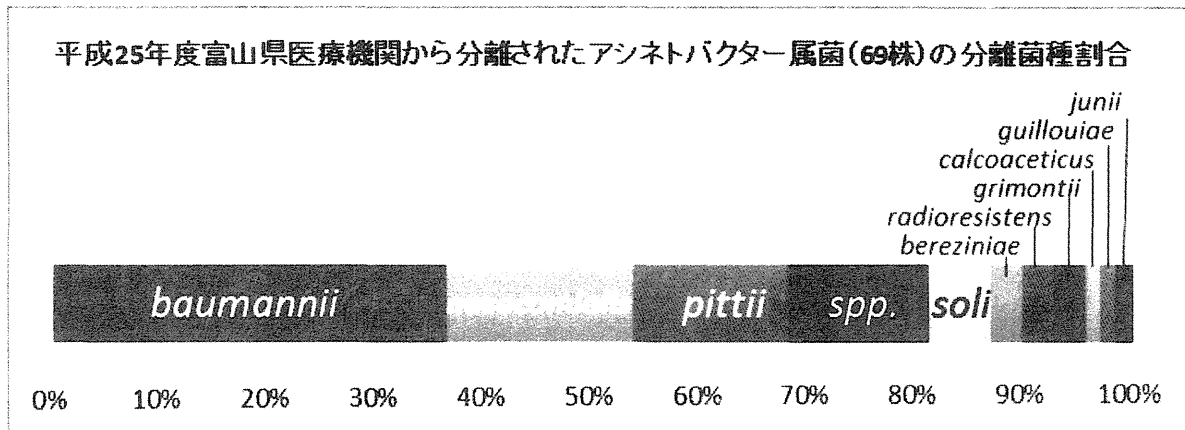
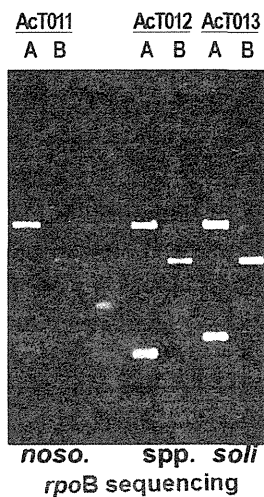


図3. 平成25年度富山県医療機関から分離されたアシネトバクター属菌69株 (*rpoB* 配列による分類) の分離菌種の割合



- ✓ AcT012は、*rpoB* 配列で *A.spp.* となるが、PCR では、*A.nosocomialis* と判定される可能性がある。しかし、700bp 増幅物が検出されない点が、他の *A.nosocomialis* (例：AcT011) と異なる。*A.spp.* と判定された株のなかに、AcT012 と同一の株が4株検出されている。
- ✓ AcT013は、*A.soli* の PCR 結果であり、ACBC のパターンとは異なる。

図4. *rpoB* 配列による鑑別で *A.spp.* と判定された株 (AcT012) の PCR 鑑別結果

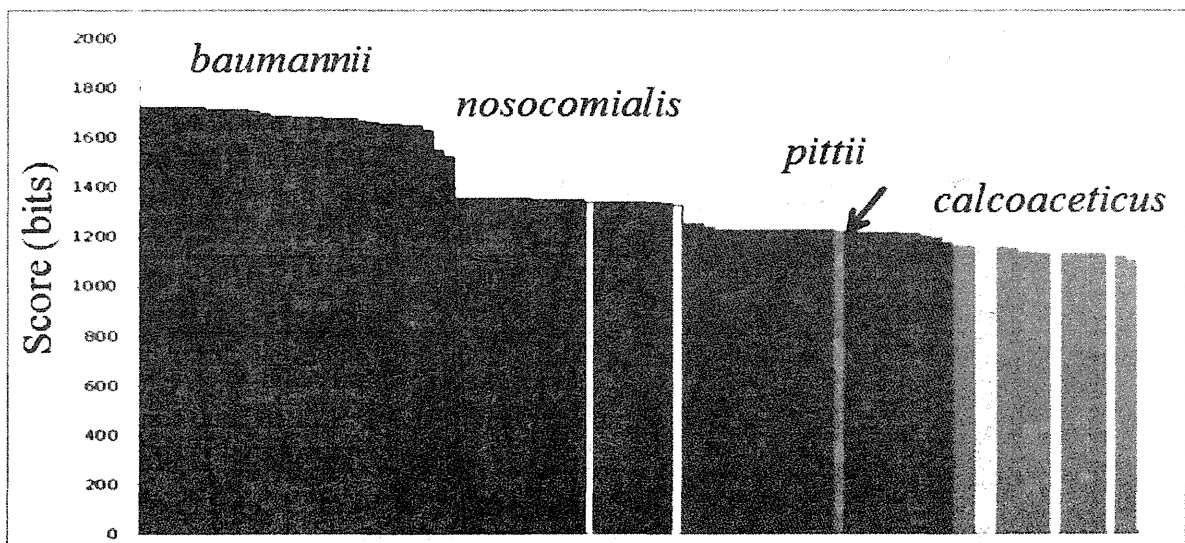


図5. *A.baumannii* の *rpoB* 861 配列をクエリーとして、Blast 検索したときの ACBC 構成菌種のビットスコア (→については、本文参照)

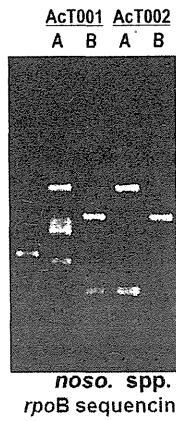


図 6. *rpoB* 配列で *A.spp* と判定されるが PCR で *A.nosocomialis* と判定された例 (AcT002)

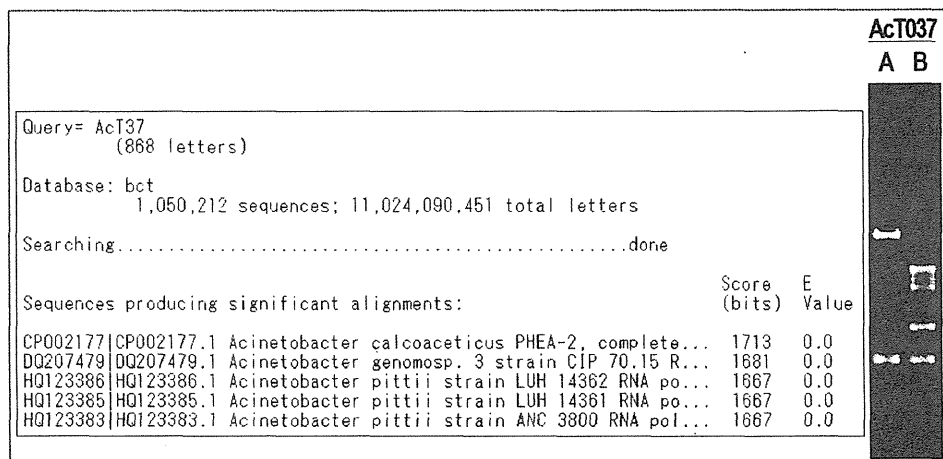


図 7. *rpoB* 配列で *A.calcoaceticus* と判定されるが PCR で *A.pittii* と判定された例 (AcT037)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
研究協力報告書

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
「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）

研究協力者 綿引 正則（富山県衛生研究所）

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

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、国立感染症研究所が全国の国立病院から収集した 998 株のアシネトバクター属菌疑い菌について菌種同定を行った。また、*A.baumannii* の MLST 解析と次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解析データに基づいた *A. baumannii* International Clone II の系統樹解析と *A.baumannii* の薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。菌種同定を実施した結果、998 株中 866 株がアシネトバクター属菌であり、そのうち *A. baumannii* が 74%と最も多く、次いで *A. nosocomialis* 10%、*A. pittii*、7%、*A. sp. close to 13TU* 2%と続くことが明らかとなった。MLST 解析の結果から秋田県と愛知県に *A. baumannii* International Clone II が侵淫していることが確認された。また SNP 系統樹解析の結果から、*A. baumannii* International Clone II についても地域に特異的な感染疫学が成立している可能性が示唆された。また、SNP 系統樹解析により、MDRA が他の *A. baumannii* International Clone II クラスターに属する株と異なる起源と感染疫学を持つ可能性が示唆された。確認された MDRA は 2 株のみであったが、院内感染防止策構築の基礎となる MDRA の感染疫学に関して、今後さらなる調査が必要である。

A. 研究目的

アシネトバクター(*Acinetobacter*)属菌は自然環境中に広く分布し、同じ非発酵菌である緑膿菌と同様にしばしば院内感染を惹起する。さらに、緑膿菌と異なり湿潤環境のみならず、乾燥状態にも耐えることから、ひとたび病院環境内に定着した場合、その除去は容易ではない。アシネトバクター属菌は 19 の Genomic Species に分類され、30 の reference strain が定められている (A.Y. Peleg, Clin.

Microbiol. Rev. 21, 538, 2008)が、従来の生化学的性状試験等では種の同定が困難である。とりわけ、医療機関において分離頻度が高いとされる *A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis*、*A. calcoaceticus* は性状がお互いに非常に類似しているために、従来法や医療機関等で汎用されている自動同定機器では鑑別が極めて困難であり、このことが国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学解明の大きな障害となってきた。実際、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が正確に反映され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。

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(MDRA)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MDRA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、国内ではMDRAによる、深刻な健康被害を伴う院内感染が既に発生していることから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感染疫学に関する知見は極めて乏しいことが対策構築上の問題である。

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昨年度から実施した。研究初年度である昨年度は、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検討し、*A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis*、*A. calcoaceticus*、*A. sp. Close to 13TU*の分離頻度が高いことを明らかにした一方、秋田県と愛知県で菌種分布に明瞭な違いがあることを示し、地域に特有の感染疫学が存在している可能性を指摘した。MDRAは確認されなかったものの*A. baumannii*には5剤以上の薬剤耐性を獲得した株が認められること、*A. baumannii*以外のアシネトバクター属菌では比較的薬剤耐性株が少ないことを明らかにした。さらに、MLST解析により愛知県には耐性傾向が強いといわれるEuropean clone IIが存在していることも示し、これまで殆ど明らかになってい

ない国内におけるアシネトバクター属菌の感染疫学の一端を明らかにすることができた。

今年度は、国立感染症研究所が全国の国立病院から収集した998株のアシネトバクター属菌疑い株について菌種同定を行った。また、*A. baumannii*のMLST解析と次世代シーケンサーを使用した全ゲノム解析データに基づいた*A. baumannii* International Clone IIの系統樹解析を行い、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集積した。さらに、次世代シーケンサーを使用して*A. baumannii*の薬剤耐性遺伝子を検索した。

B. 研究方法

1. アシネトバクター属菌の菌種同定

国立感染症研究所が全国78の国立病院から収集した998株のアシネトバクター属菌疑い株を菌種同定に供した。菌種の同定は、Bernard La Scolaらが報告(J. Clin. Microbiol., Vol.44, p. 827-83, 2006)した*rpoB*遺伝子のDNAシーケンス解析と、Jane F Turtonらが報告(J. Clin. Microbiol., Vol.44, p. 2974-2976, 2006)した*A. baumannii*に特異的(Intrinsic)なOXA51-like遺伝子を標的とするPCR法を併用して実施した。但し、*rpoB*遺伝子の増幅にはAc696FとAc1598Rプライマーを使用し、シーケンスプライマーにはAc696Fを使用した。PCRにはEX Taq DNA Polymerase (Takara Bio)を使用し、シーケンス用テンプレートの精製にはIllustra ExoProStar (GE Healthcare)を使用した。DNAシーケンスの決定はファスマック(株)に外注した。*rpoB*遺伝子の増幅がみられなかった供試株については16SリボゾーマルRNAのシーケンスにより菌種を確認した。

2. *A. baumannii* の MLST 解析

愛知県で分離された *A. baumannii* 20 株と秋田県で分離され、調査した薬剤に何らかの耐性が認められた 18 株についてパスツール研究所

(www.pasteur.fr/mlst) の方法に従い MLST 解析した。

3. 全ゲノム解析による系統樹解析と薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された 4 株の *A. baumannii* International Clone II と秋田県で分離された 3 株の *A. baumannii* International Clone II を供試し、次世代シーケンサーを使用して全ゲノム解析を行った。得られたデータと、国立感染症研究所で解析した MDRA 3 株のデータ、GenBank に登録された国内外の株のデータを併せて single nucleotide polymorphisms (SNP) による系統樹解析を行った。系統樹解析は MUMer (Genome Biology, 5:R12, 2004) を用いた SNP 抽出、FastTree (PLoS ONE, 5(3):e9490, 2010) による系統樹解析、MEGA5 (Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739, 2011) による系統樹描画の手順で行った。また、ResFinder 2.1 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) により薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。

4. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は KB 法により実施した。供試薬剤はセフォタキシム (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)、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)、スルフイソキサゾール (G) とした。

C. 研究結果

1. アシネトバクター属菌の菌種同定

998 株のアシネトバクター属菌疑い株のうち、866 株がアシネトバクター属菌であった。これらの株の *rpoB* 遺伝子シーケンスに基づき作成した系統樹を図 1 に示した。*A. baumannii*、*A. nosocomialis*、*A. sp. close to 13TU*、*A. pittii*、*A. calcoaceticus/oleivorans*、その他の菌種が系統樹上でそれぞれ同一のクラスターに分類されることが示され、*rpoB* 遺伝子のシーケンス解析がアシネトバクター属菌の同定に極めて有用であることが確認できた。一方、*rpoB* 遺伝子のシーケンスにより *A. baumannii* と同定された 645 株のうち、1 株以外は OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法が陽性となることが確認された。OXA51-like 遺伝子 PCR が陰性となった 1 株について OXA51-like 遺伝子のシーケンスを解析した結果、これらの株では OXA51-like 遺伝子に Insertion Sequence (IS) が挿入されていることが明らかとなった。

図 2 にアシネトバクター属菌 866 株の菌種を円グラフで示した。菌種は検出数が多い順に *A. baumannii* 645 株 (74%)、*A. nosocomialis* 84 株 (10%)、*A. pittii*、60 株 (7%)、*A. sp. close to 13TU* 15 株 (2%) であった。データは示さないが、感染症法に規定する MDRA の報告基準に該当する *A. baumannii* は 645 株中 2 株のみであった。

2. *A. baumannii* の MLST 解析

表 1 に愛知県で分離された *A. baumannii* 20 株と秋田県で分離された *A. baumannii* 18 株の MLST 解析の結果を示した。愛知県では 20 株中 9 株 (45%) が ST2、8 株が ST33 から ST235slv の 5 種類の MLST Type、3 株が既知 Type に該当しない MLST Type であったのに対

して、秋田県では 18 株中 17 株 (94%) が ST2、1 株のみが ST22 であり、両県とも International clone II がすでに分布していることが示された。

3. 全ゲノム解析による系統樹解析と薬剤耐性遺伝子の検索

愛知県で分離された 4 株の *A. baumannii* International Clone II、秋田県で分離された 3 株の *A. baumannii* International Clone II、国立感染症研究所で解析した MDRA 3 株、そして国内外で報告されたデータを併せて作成した SNP 系統樹を図 3 に示した。国内で分離された *A. baumannii* International Clone II は愛知株、秋田株と共に同一のクラスターに分類され、これらが非常に近縁な株であることが明らかとなった。また、秋田県と、愛知県由来株は各県内由来株によるサブクラスターを形成していた。これに対して、国立感染症研究所で解析した MDRA はこれらとはやや距離が離れたクラスターに分類された。一方、海外で分離された株については、系統樹の外周に位置する多彩な距離に分類され、国内株とは遺伝的な隔たりが大きいことが示された。

供試した 7 株の *A. baumannii* の全ゲノム解析の結果検出された薬剤耐性遺伝子の一覧と、秋田株 3 株の KB 法による感受性試験の結果を表 2 に示した。7 剤に耐性を示す AC18 株と AC45 からはそれぞれ 12 種類と 8 種類、5 剤に耐性を示す AC34 からは 5 種類の耐性遺伝子が検出された。愛知株についても 7 種類から 12 種類の耐性遺伝子が検出された。アミカシン耐性を示した AC18 は、アミノグリコシド耐性に関与する *aadA1*、*aac(6')iB-cr*、*armA* 遺伝子を保有していた。*armA* 遺伝子は愛知株 4 株中 3 株にも検出されており、アミノグリコシドの

高度耐性に関与するこの *methylase* 遺伝子が国内の *A. baumannii* に侵淫していることが示された。

D. 考察

医療機関の細菌検査室や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感染疫学はその多くが不明である。今回、我々は国立感染症研究所が全国 78 の国立病院から収集したアシネトバクター属菌 866 株について菌種の同定を行い、国内の医療機関におけるアシネトバクター属菌の分離状況を明らかにした。その結果から、*A. baumannii* が 645 株 (74%) と最も多く、次いで *A. nosocomialis* 84 株 (10%)、*A. pittii*、60 株 (7%)、*A. sp. close to 13TU* 15 株 (2%) と続くことが示された。国内の医療機関で分離されるアシネトバクター属菌約 900 株弱について菌種を遺伝子レベルで決定した例はこれまでになく、今回我々が示した成績は国内初のデータとなる。

今回も昨年度同様、*rpoB* 遺伝子のシーケンス解析に基づきアシネトバクター属菌の同定を行った。その結果、同一菌種が系統樹上でそれぞれ同一のクラスターに分類されることが示され、*rpoB* 遺伝子のシーケンス解析がアシネトバクター属菌の同定に有用であることが改めて確認できた。866 株もの分離株を供試して *rpoB* 遺伝子の系統樹解析を実施した例も国内ではこれまでになく、今回我々が得た成績はアシネトバクター属菌の菌種同定法としての *rpoB* 遺伝子のシーケンス解析の有用性を示す貴重なデータといえる。同様に、OXA51-like 遺伝子を標的とする PCR 法が *A. baumannii* の同定法として有用であることも示し得たが、OXA51-like 遺伝子に IS が挿入されたこ