

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 *Acinetobacter baumannii* 国際流行株の鑑別法の開発

分担研究者 荒川 宜親（名古屋大学 分子病原細菌学／耐性菌制御学）
研究協力者 鈴木 匡弘（愛知県衛生研究所）

研究要旨

多剤耐性傾向の強い *Acinetobacter baumannii* の世界流行クローンである、international clone I (ICI)および II (IC II)を PCR のみで鑑別する PCR-based ORF typing (POT)法の開発を目的とした。アシネトバクター属菌の全ゲノムデータ比較によって、IC I 及び IC II の鑑別を行うための 7 個の ORF、*A. baumannii* マーカーとして OXA-51、さらに *A. pittii*、*A. nosocomialis* および *Acinetobacter* sp. close to *A. nosocomialis* のそれぞれの菌種に特異的な ORF、及びアシネトバクター属菌マーカーを選び出し、12-plex PCR によって検出することとした。今回開発した POT 法を用いることで、臨床分離されたアシネトバクター属菌から簡便かつ迅速に世界流行クローンを鑑別することが可能となり、日本における多剤耐性アシネトバクターの蔓延を防止する上で大きく貢献できるものと考えられる。

A. 研究目的

アシネトバクター属菌は、近年、病院で院内感染の原因として問題となっている病原細菌である。特に、*Acinetobacter baumannii* では、カルバペネム、アミノ配糖体、ニューキノロンに広範な耐性を獲得した多剤耐性株の増加と蔓延が問題となっており、重要な感染制御の対象菌種となっている。欧州や米国の医療機関では、多剤耐性を獲得した *A. baumannii* が増加し大きな問題となっている。しかし、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業の集計によれば、国内の主要な病院で分離される多剤耐性アシネトバクターの割合は、1%以下であり、我が国ではこの状態を今後も維持する必要がある。以上のことから、多剤耐性を獲得した *A. baumannii* の国内の医療機関での増加や蔓延を防止するため、本耐性菌を早期に検出することが重要となっている。多剤耐性アシネトバクターは multilocus

sequence typing (MLST)によって特定のクローンが蔓延していることが明らかになっており、international clone I (Pasteur ST1 または Bartual CC109) および international clone II (Pasteur ST2 または Bartual CC92)が主要な多剤耐性クローンである。しかし、医療機関の一般医的な細菌検査室や検査センターなどでは、シーケンス解析による *A. baumannii* およびその流行株を正確に同定、識別することが困難である。そこで PCR のみで *A. baumannii* およびその流行株を正確に同定、識別可能な方法、すなわち PCR-based ORF typing (POT)法の開発を行った。

B. 研究方法

A. baumannii 全ゲノムデータ [AB0057 (AN: CP001182), AB307-0294 (AN: CP001172), AYE (AN: CU459141), ACICU (AN: CP000863), ATCC17978 (AN: CP000521), SDF (AN: CU468230) (AN:

アクセッション番号)]を比較し、菌株毎に保湯状態の異なる ORF を抽出し、POT 法開発の候補 ORF とした。臨床分離株における候補 ORF 保有パターンを PCR で調査し、POT 法に採用する ORF の選定を行った。

また、生化学性状による同定の困難な *Acinetobacter calcoaceticus - baumannii* complex の菌種を鑑別するために、*A. pittii* (D499, AN: AGFH00000000; DSM9306, AN: AIEF00000000; DSM21653, AN: AIEK00000000; SH024, AN: NZ_ADCH00000000), *A. nosocomialis* (NCTC8102, AN: AIEJ00000000 and RUH2624, AN: NZ_ACQF00000000), *A. calcoaceticus* (PHEA-2, AN: CP002177; DSM30006, AN: NZ_APQI00000000; RUH2202, AN: NZ_ACPK00000000), *Acinetobacter* species close to *A. nosocomialis* (GG2, AN: ALOW00000000)ゲノムデータの比較を行い、種特異的な ORF の選別を行った。

81 株の *A. baumannii* 臨床分離株を新たに開発した POT 法によってタイピングし、その結果を MLST 解析(Pasteur)と比較した。

C. 研究結果 (表 1)

7 個の ORF の保有パターンによって国際流行株の鑑別ならびにその他のクローンの大別を行う事ができた。また、臨床分離されることが多い *A. baumannii*、*A. pittii*、*A. nosocomialis* および *Acinetobacter* sp. close to *A. nosocomialis* の 4 菌種のマーカーとなる ORF を見いだすことができた。上記 11 個の ORF にアシネトバクター属菌マーカーを加えた 12 個の ORF を 1 反応系列の multiplex-PCR で増幅、電気泳動によって ORF 保有パターンを確認する系を確立できた。

81 株の *A. baumannii* 臨床分離株を POT

法と MLST 法でタイピングしたところ、international clone I と II はそれぞれに固有のパターンとなり他のクローンから鑑別できた。international clone I と II の ORF 保有パターンはその他のクローンとは少なくとも ORF 2 個以上の違いがあった。その他の株は 18 clonal complex に分類されたが、POT 法では 17 種類に分類できた。

またアシネトバクター属菌の菌種マーカーはそれぞれの菌種に特異的であった。しかし *A. pittii* では感度がやや悪く約 95%であった。

D. 考察

今回開発した POT 法は PCR のみで *A. baumannii* 国際流行株を選別することができた。本法の活用によって臨床上問題となりやすい株を効率よく選別できることから、*A. baumannii* の耐性菌蔓延防止に役立つと期待される。また本法は世界流行株の選別ができるのみならず、MLST に近い結果が得られるため、新たな薬剤耐性クローンが出現した場合にも鑑別できる可能性があり、広範囲なクローンの鑑別に利用可能と期待される。

POT 法によるタイピング結果は MLST 解析との相関関係が見られ、黄色ブドウ球菌や緑膿菌と同様の傾向であった。多くの菌種で ORF 保有パターンによる MLST 型の推定が可能かもしれない。今後、PCR による容易な菌株のタイピング法が普及することによって、通常の細菌検査室においても分子疫学解析が可能となることが期待される。

E. 結論

今回開発した POT 法を用いることで臨床分離されたアシネトバクター属菌から簡便かつ迅速に世界流行クローンを鑑別することが可能となり、日本における

多剤耐性アシネトバクターの蔓延を防止
する上で大きく貢献できるものと考えら
れる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

Suzuki M, Hosoba E, Matsui M, Arakawa
Y. New PCR-based open reading frame
typing method for easy, rapid, and reliable
identification of *Acinetobacter baumannii*
international epidemic clones without
performing multilocus sequence typing. J
Clin Microbiol. 2014 52: 2925-32.

学会発表

1) 鈴木匡弘他、*Acinetobacter baumannii*

国際流行株の鑑別法の開発、第 42 回薬剤
耐性菌研究会 2013 年 10 月、熱海市

2) 鈴木匡弘、荒川宜親 細菌検査室で
実施可能な *Acinetobacter baumannii* 国際
流行株の鑑別法の開発と臨床応用、第 60
回臨床検査医学会、2013 年 11 月 神戸
市

3) 鈴木匡弘他、*Acinetobacter baumannii*
国際流行株の鑑別法の開発、第 25 回日本
臨床微生物学会、2014 年 2 月 名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2014-61751/PCT/JP2014/058236 ア
シネトバクター属菌の遺伝型タイピン
グ法及びこれに用いるプライマーセッ
ト

表1 POT 法に採用した ORF の保有パターンと MLST との関係

POT number	ST (CC or allele profile)	Number of isolates	ORF											
			<i>Acinetobacter</i> specific	OXA 51	<i>A. pittii</i> specific	<i>A. nosocomialis</i> specific	<i>A</i> sp-specific	AB57_2484	ACICU_02042	ACICU_02966	ACICU_01870	AB57_3308	ACICU_03137	AB57_0815
<i>A. baumannii</i>														
122	ST2 (CC2)	27	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
69	ST1 (CC1)	3	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
0	ST235 (CC33)	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	ST33 (CC33)	18	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8	ST148	1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
32	CC33 (3-5-7-1-12-1-2)	2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
32	ST239 (CC216)	1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
44	new (1-4-2-1-42-1-4)	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
44	ST40	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
10	ST52	1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
40	CC10 (1-3-2-1-4-1-4)	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
41	ST49	1	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
56	ST142	1	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
72	ST152	4	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
73	ST212	1	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
92	ST246	1	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
96	CC216 (3-4-2-2-7-2-2)	1	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
104	ST34 (CC34)	9	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
104	new (27-2v-2v-1-9-2-5)	3	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
104	ST145 (CC216)	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-

106	CC109 (3-4-2-2-9-1-5)	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
108	ST133	1	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>A. pittii</i>														
66	NA ^a	9	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
70	NA ^a	1	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
74	NA ^a	2	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
74	NA ^a	1	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
76	NA ^a	1	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
78	NA ^a	6	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>A. nosocomialis</i>														
97	NA ^a	1	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
104	NA ^a	26	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
105	NA ^a	49	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
105	NA ^a	1	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>A. species close to A. nosocomialis</i>														
41	NA ^a	7	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
105	NA ^a	4	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
109	NA ^a	2	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
125	NA ^a	2	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

^a Not adopted.

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

臨床分離大腸菌におけるプラスミド伝達性キノロン耐性遺伝子の耐性機構に関する研究

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 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）
後藤 謙介（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）
服部 達也（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）

研究要旨：近年、臨床分離 腸内細菌科菌種におけるプラスミド伝達性キノロン耐性(PMQR)遺伝子の保有率の増加が問題となりつつある。我々は、これまでの研究で細菌が PMQR 遺伝子(*qnrA*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*)を獲得する意義について解析を進めてきた。そして、fluoroquinolone (FQ)高度耐性大腸菌の中で主流となっている O25b:H4-ST131 株において、*qnrA* 遺伝子の獲得が ciprofloxacin (CPFX)存在下における細菌の生存延長に寄与することを見いだした。本研究では、さらに研究をすすめて、様々な血清型の FQ 感性大腸菌を用いて *qnrA* 遺伝子の獲得が細菌の生存力へ寄与することを確認するとともに、本遺伝子の獲得がキノロン耐性決定領域(QRDRs)変異の獲得ならびに FQ 耐性化の促進に影響するか否かについて解析を行った。菌株は FQ 感性大腸菌 13 株(O1, O6, O18, O25, O74, O78, OUT)を用い、それらに *qnrA* 遺伝子を形質転換にて導入し、CPFX の MIC, 最小殺菌濃度(MBC)および耐性菌出現阻止濃度(MPC)の測定を行った。全ての親株ならびに *qnrA* 導入株について、 $2 \times$ MIC または $3 \times$ MIC の CPFX 暴露時における殺菌効果曲線を作成した。O1 株および O25 株については CPFX に対する適応耐性試験もあわせて実施した。*qnrA* 遺伝子を導入した結果、CPFX の MIC, MBC, MPC はいずれも親株と比較して上昇しており、特に、O25 株における MBC および MPC は他の血清型よりも高い値を示した。*qnrA* 導入株における $2 \times$ MIC の CPFX 暴露では、O1, O6, O25 株の生存延長が認められたが、残りの菌株 (O18, O74, O78, OUT)では菌の死滅が確認された。一方、 $3 \times$ MIC の CPFX 暴露において、菌の生存が確認されたものは O25 株のみであった。適応耐性試験では、親株、*qnrA* 導入株とも継代回数に伴って CPFX の MIC が上昇した。しかし、これら適応耐性株における *gyrA* 遺伝子の QRDRs 変異は、*qnrA* 遺伝子を保有しない親株が最も早い結果となった。本研究から、低度 FQ 耐性を付与する *qnrA* 遺伝子の獲得は致死濃度の CPFX 暴露時における細菌の生存を延長させるが、必ずしも QRDRs 変異獲得および蓄積を促進させないことが明らかとなった。

A. 研究目的

臨床現場における fluoroquinolones (FQs) の使用増加に伴い、急激に FQs 耐性菌が増加している。従来、その耐性メカニズムは FQs の作用点である DNA ジャイレース (*GyrA*)およびトポイソメラーゼ IV (*ParC*) におけるキノロン耐性決定領域(QRDRs)のアミノ酸置換が主たるものであったが、新たにプラスミド伝達性キノロン耐性 (PMQR) 遺伝子が出現し、腸内細菌科菌種の間で急速に広まりつつある。しかし、これら PMQR 遺伝子は低度 FQs 耐性を付与する

に留まるため、細菌がなぜそれら遺伝子を獲得するかについて研究者の関心が集まっている。我々は、これまでの研究で細菌が PMQR 遺伝子(*qnrA*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*)を獲得する意義について解析を進めてきた。そして、FQ 高度耐性大腸菌の中で主流となっている O25b:H4-ST131 株においては、*qnrA* 遺伝子の獲得が ciprofloxacin (CPFX)存在下における細菌の生存を延長させることを見いだした。しかしながら、本現象が各種 O 抗原に普遍的であるか否か、また FQ 高度耐性化への関与については、未だ不明のま

までである。本研究では、*qnrA* 遺伝子の獲得が細菌の生存力へ寄与することを様々な血清型の FQ 感性大腸菌を用いて証明するとともに、本遺伝子の獲得が QRDRs 変異の獲得ならびに FQ 耐性化の促進に影響するかどうかについて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

菌株には、FQs に感性を示す大腸菌 13 株 (O1, O6, O18, O25, O74, O78, OUT) を用いた。はじめに使用菌株の MLST 解析および PCR によるタイピングを実施した。各株に *qnrA* 遺伝子を導入後、CPFEX の MIC、最小殺菌濃度 (MBC) ならびに耐性菌出現阻止濃度 (MPC) を測定した。MIC 測定は Etest により、MBC および MPC は既報に従い、実施した。以後、空ベクターを各株に導入したものを親株とした。次に、全ての親株ならびに *qnrA* 導入株を対象にして、 $2 \times \text{MIC}$ または $3 \times \text{MIC}$ の CPFEX に暴露後の殺菌効果曲線を作成した。さらに CPFEX 存在下での生存延長が確認された O1 株および O25 株について、CPFEX に対する適応耐性試験を実施した。CPFEX の暴露濃度はそれぞれの菌株の $1/2 \times \text{MIC}$ に設定し、20 回の継代培養を行った。そして、得られた適応耐性株における CPFEX の MIC の変化を解析するとともに、*gyrA*, *parC* 遺伝子における QRDRs の塩基配列解析を行った。

C. 研究結果

MLST 解析および PCR によるタイピングの結果、大腸菌 13 株の内 7 株が ST95 と同定され、O25 株および OUT 株の 3 株は O25b-ST131 と同定された。*qnrA* 遺伝子の導入により CPFEX の MIC は親株と比較して 20.8-31.7 倍程上昇したが、その値は感性のままであった ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$)。また MBC および MPC も同様に *qnrA* 遺伝子の導入によって上昇しており、特に O25 株における *qnrA* 導入株の MBC および MPC はそれぞれ 0.75-1.14 $\mu\text{g/mL}$, 3-4 $\mu\text{g/mL}$ と他の血清型よりも高い値を示した (Table 1)。

殺菌効果曲線による検討では、 $2 \times \text{MIC}$ の CPFEX 暴露において、親株は全て暴露開始から 48 時間経過するまでに菌が完全に死滅した。一方、*qnrA* 導入株では、O1, O6, O25 株の 6 株は暴露開始から 48 時間経過後も菌の生存が確認されたが、残りの菌株 (O18, O74, O78, OUT) は 48 時間以内に菌が完全に死滅していた (Figure 1)。 $3 \times \text{MIC}$ の CPFEX

暴露では、暴露から 48 時間経過後も菌の生存が確認されたものは、O25 株のみであった (Figure 2)。

CPFEX 存在下での生存延長が確認された O1 株と O25 株で実施した適応耐性試験では、両 O 抗原とも継代回数に伴って親株ならびに *qnrA* 導入株における CPFEX の MIC が上昇した。20 回継代後の親株の MIC は O1 株が 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、O25 株が 4 $\mu\text{g/mL}$ に達し、*qnrA* 導入株の MIC は O1 株および O25 株ともに 32 $\mu\text{g/mL}$ に達した (Figure 3)。適応耐性株における *gyrA* 遺伝子の QRDRs 変異はいずれの菌株でも確認され、変異によるアミノ酸置換は全て Ser83-Lue であった。変異獲得時期は O25 株の親株が 4 週目と最も早く、続いて O25 株の *qnrA* 導入株 (13 週目)、O1 の親株 (14 週目)、*qnrA* 導入株 (15 週目) の順となり、両 O 抗原ともに親株の方が早い結果となった (Table 2)。一方、*parC* 遺伝子の QRDRs 変異は、両 O 抗原ともに *qnrA* 導入株のみで継代 17 週目に確認された (Ser80-Arg/ParC)。

D. 考察

qnrA 遺伝子の獲得によって細菌は FQs に対して低度耐性を獲得すると報告されており、本研究においても、CPFEX の MIC, MBC および MPC の上昇は同程度であった。興味深いことに、O25 株の MBC および MPC の値は他の O 抗原よりも高く、特に MPC (3-4 $\mu\text{g/mL}$) は CPFEX 500 mg を 1 日 2 回経口投与した際の最高血中濃度と同程度もしくはそれを上回る値となった。従って、O25 株における *qnrA* 遺伝子の獲得は、CPFEX 治療下での長期間の生存を可能とし、FQ 耐性化において有利に働いているものと考えられる。

実際に、今回の殺菌効果曲線による検討では *qnrA* 遺伝子導入によって生存延長が確認された。加えて、Briales ら (Antimicrob Agents Chemother, 2011) や Allou ら (Antimicrob Agents Chemother, 2009) も同様に *qnrA* 遺伝子の獲得が CPFEX 存在下での細菌の生存を延長させると報告しており、細菌が致死濃度の CPFEX に暴露された際に、*qnrA* 遺伝子の獲得が細菌の生存延長に寄与することは確からしいと考えられる。一方で、同一の ST を示す O25-ST131 株と OUT-ST131 株の間では生菌数の減少傾向に明確な差が確認されており、*qnrA* 遺伝子獲得による生存延長には、O 抗原の発現の有無が関与していることが疑われた。さらに O25-ST131 株は、唯一 $3 \times \text{MIC}$ の CPFEX 暴

露でも生存が確認されており、*qnrA* 遺伝子獲得による生存延長の影響を最も強く受けることが示唆された。

qnr 遺伝子の獲得は FQ 暴露時の細菌の生存を延長させる他に、FQ 耐性化を促進させる働きがあると考えられてきたが、本研究の適応耐性試験において QRDRs 変異獲得時期は親株が最も早く、従来の仮説と異なる結果を示した。一方で、Cesaro ら(J Antimicrob Chemother. 2008)の解析では高濃度の CPFX や moxifloxacin による暴露において、QRDRs 変異の獲得頻度は親株の方が *qnr* 導入株よりも高いと報告しており、解析方法は異なるものの本研究の結果と傾向が一致した。このことから *qnrA* 遺伝子の獲得は、QRDRs 変異の獲得および蓄積を促進しないことが示唆された。おそらくこれは、*qnrA* 遺伝子獲得による CPFX 存在下での生存延長が、細菌にとって増殖に不利となる QRDRs 変異を早期に獲得する必要性を低くしているためであると考えられる。しかし、これらはすべて *in vitro* における解析結果であるため、今後は *in vivo* での解析が求められる。

E. 結論

本研究から、特定の血清型や遺伝的背景によって傾向は異なるものの、低度 FQ 耐性を付与する *qnrA* 遺伝子の獲得は致死濃度の CPFX 暴露時における菌株の生存を延長させるが、必ずしも QRDRs 変異獲得や蓄積を促進させないことが明らかとなった。さらに、*qnrA* 遺伝子の獲得がもたらす生存力への影響は O25 株が最も強く、これが大腸菌 O25b:H4-ST131 の世界的な蔓延の一因となっている可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Contribution of QnrA, plasmid-mediated quinolone resistance peptide, to survival of *Escherichia coli* exposed to lethal ciprofloxacin concentration. Jpn. J. Infect. Dis. 2014. *in press*

2. 学会発表

1) Goto K., Kawamura K. and Arakawa Y. Contribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes to QRDR mutations in *Escherichia coli*. 第 86 回 日本細菌学会総会. 日本細菌学会誌. 2013. 第 68 巻, 189 項

2) Goto K., Kawamura K.a and Arakawa Y. Contribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes to QRDR mutations in *Escherichia coli*. 第 28 回国際化学療法学会. 予稿集 52 頁

3) 後藤謙介, 川村久美子, 荒川宜親. 大腸菌のフルオロキノロン耐性獲得におけるプラスミド伝達性キノロン耐性遺伝子 *qnrA* の寄与. 第 25 回日本臨床微生物学会総会. 日本臨床微生物学雑誌. 2013. 第 23 巻, 203 項

4) Goto K., Kawamura K., Arakawa Y. Contribution of QnrA to survival of *Escherichia coli* exposed to lethal ciprofloxacin concentration. 第 87 回日本細菌学会総会. 日本細菌学会雑誌. 2014. 69, 195 項

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきもの無し

Table 1. MIC, MBC, and MPC of ciprofloxacin for the parent strains and transformants

<i>E. coli</i> strain	Serotype	MLST	MIC (µg/mL)		MBC (µg/mL)		MPC (µg/mL)	
			Parent strain	Transformant	Parent strain	Transformant	Parent strain	Transformant
No.3	O1:H 12	ST95	0.008	0.19	0.016	0.285	0.19	0.75
No.16	O1:H UT	ST95	0.012	0.25	0.018	0.5	0.19	0.75
No.155	O6:H UT	ST92	0.006	0.19	0.006	0.475	0.19	1
No.252	O6:H UT	ST95	0.008	0.19	0.012	0.38	0.19	0.5
No.92	O18:H 7	ST95	0.006	0.19	0.006	0.38	0.19	1
No.286	O18:H 7	ST95	0.008	0.25	0.016	0.375	0.094	0.75
No.23	O25:H 4	ST131	0.012	0.38	0.024	1.14	0.19	4
No.41	O25:H 4	ST131	0.012	0.25	0.012	0.75	0.38	3
No.27	O74:H 7	ST95	0.012	0.38	0.018	0.38	0.38	1.5
No.205	O74:H 7	ST95	0.008	0.25	0.012	0.375	0.19	0.75
No.189	O78:H 6	ST3200	0.008	0.25	0.016	0.375	0.094	1
No.485	O78:H UT	ST23	0.008	0.19	0.012	0.38	0.094	0.75
No.65	OUT ^a :H 4	ST131	0.016	0.38	0.024	0.38	0.19	1.5

OUT, O-antigen untypable; HUT, H-antigen untypable.

^a OUT strain was identified as serotype O25b by PCR using specific primer set (rfbO25b.r; 5'-TGCTATTCATTATGCGCAGC-3'

and rfb1bis.f; 5'-ATACCGACGACGCCGATCTG-3')

Table 2. MIC and amino acid substitutions in the QRDRs of O1-ST95 strains and O25b-ST131 strains

<i>E. coli</i> strain		No. of passages	MIC of CIPFX (µg/mL)	Amino acid substitutions in the QRDRs	
				GyrA	ParC
O1-ST95	Parent strain	P0	0.012	wt	wt
		P14	0.25	S83L	wt
	Transformant	P0	0.25	wt	wt
		P15	6	S83L	wt
		P17	32	S83L	S80R
O25b-ST131	Parent strain	P0	0.012	wt	wt
		P4	0.38	S83L	wt
	Transformant	P0	0.38	wt	wt
		P13	4	S83L	wt
		P17	24	S83L	S80R

wt, wild type.

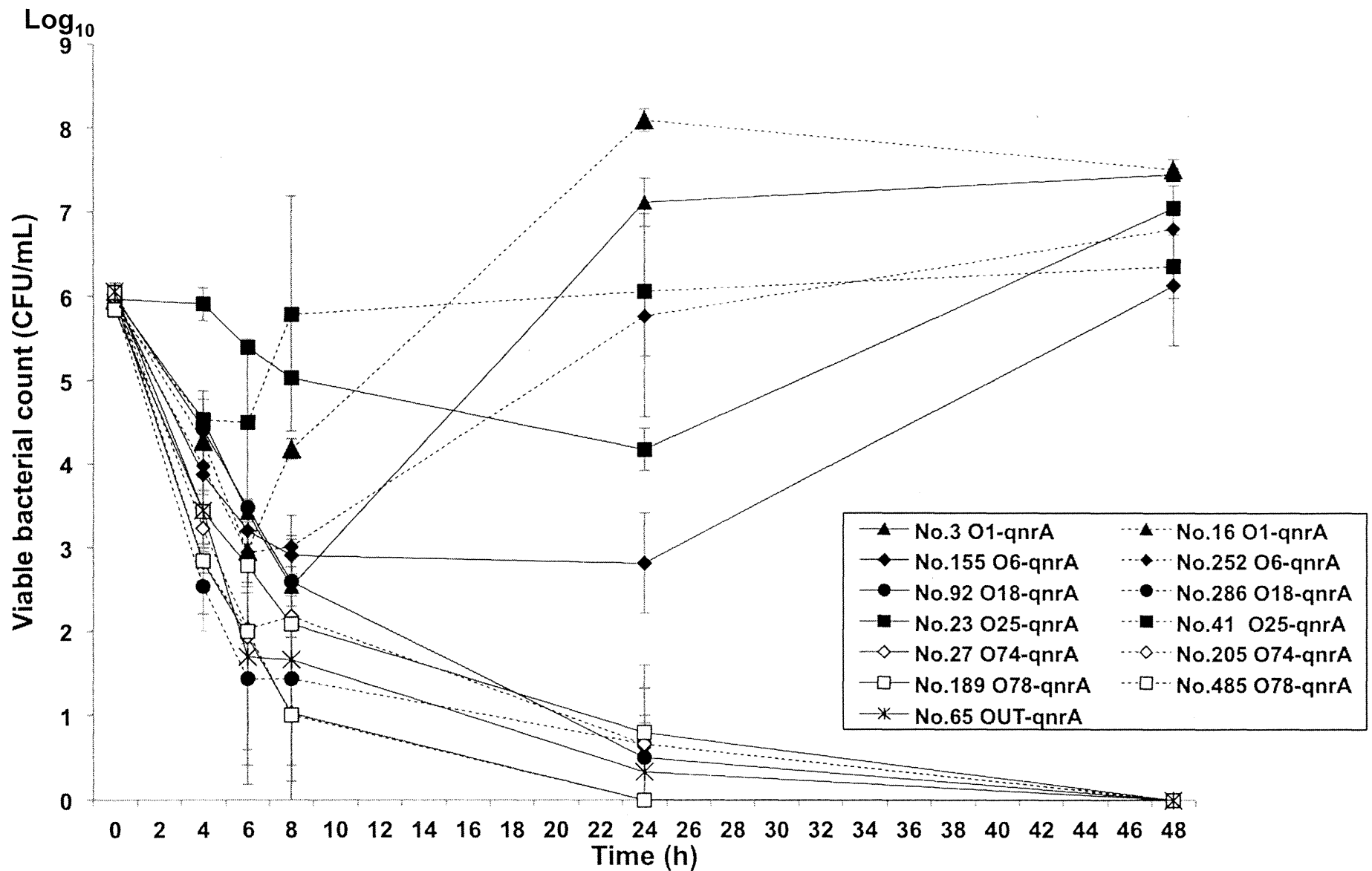


Figure 1. Viable bacterial counts in time-kill curve assays with $2 \times \text{MIC}$ of CPFX

Killing curve assays were performed in the LB broth containing $2 \times \text{MIC}$ of CPFX. All experiments were performed in triplicate, and the values reported represent the mean values. Error bars represent standard deviations (SD) of results from three experiments.

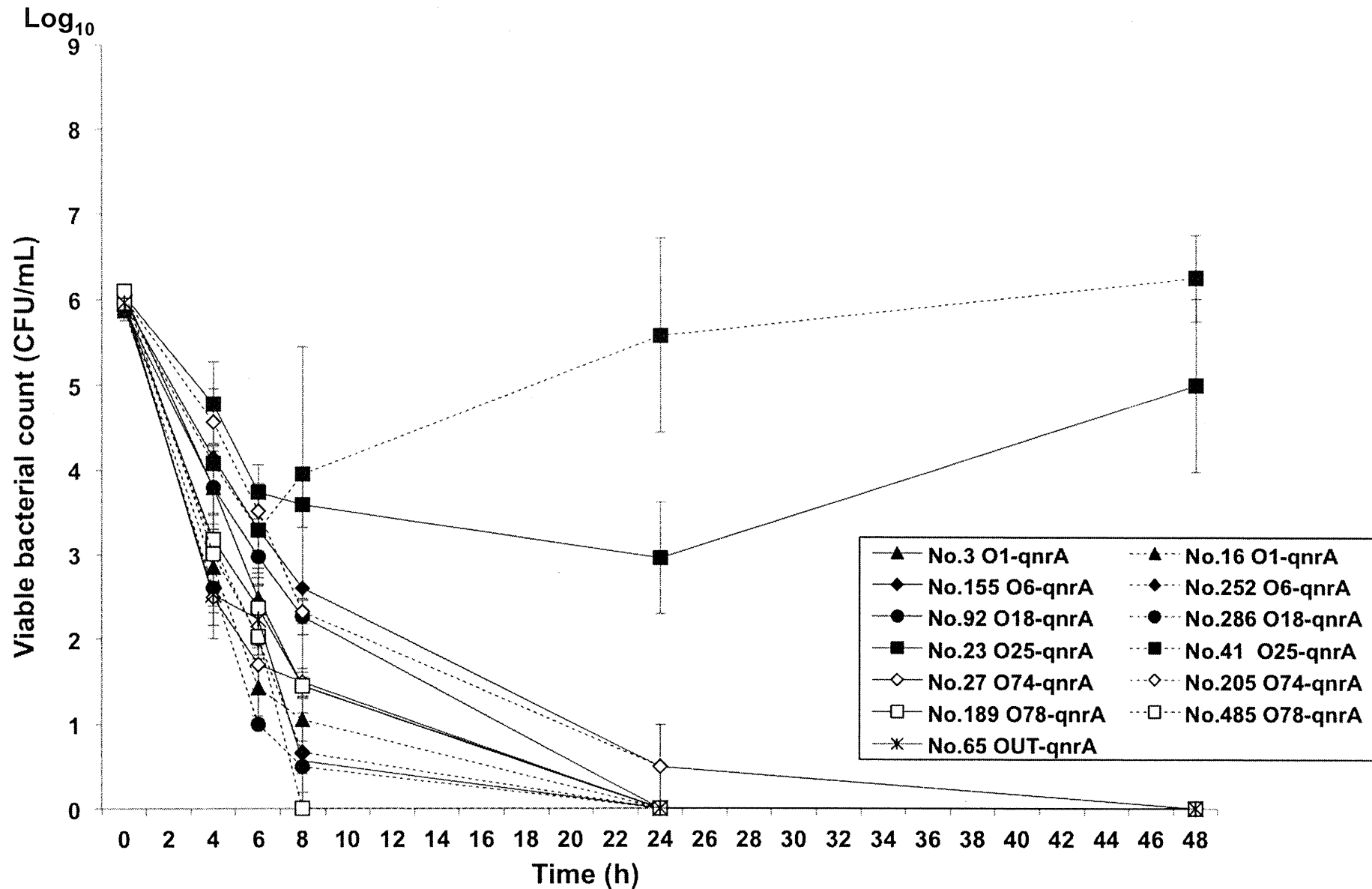


Figure 2. Viable bacterial counts in time-kill curve assays with $3 \times$ MIC of CPFX

Killing curve assays were performed in the LB broth containing $3 \times$ MIC of CPFX. All experiments were performed in triplicate, and the values reported represent the mean values. Error bars represent standard deviations (SD) of results from three experiments.

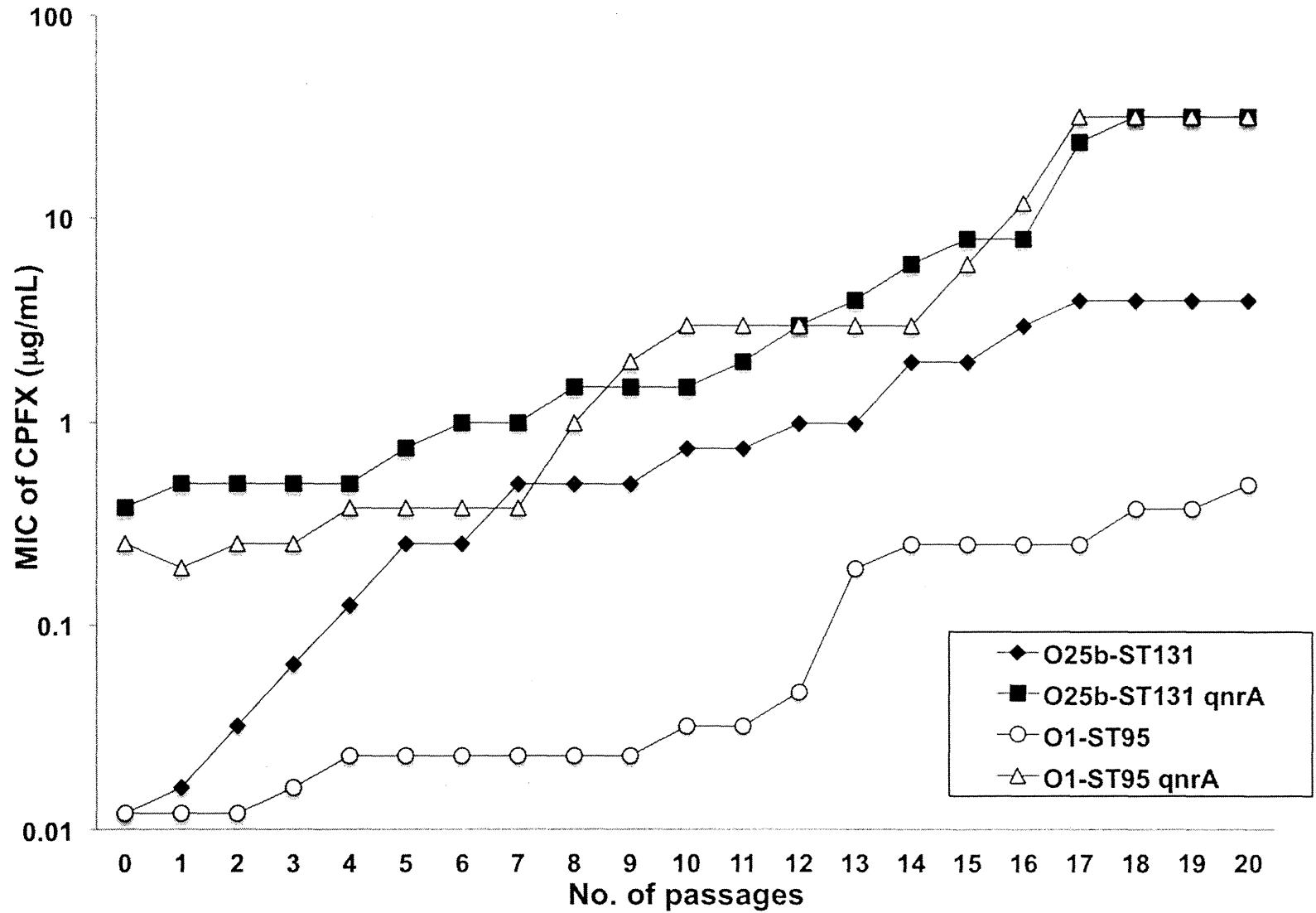


Figure 3. Adaptation to CPFEX after persistent passages

Adaptation to CPFEX was generated by repeated subculture in LB broth containing CPFEX. The 1/2 MIC cultures were incubated at 37°C with shaking for 5 days, and growth was assessed visually for cultures growth in media containing CPFEX. MICs of CPFEX were checked, all isolates were incubated new LB broth containing CPFEX. This procedure was repeated a total of 20 times every 5 days.

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

食品における基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌の汚染状況に関する研究

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 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）
後藤 謙介（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）
中根 邦彦（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学・院生／耐性菌制御学、岡崎市保健所）

研究要旨：我が国では徹底した抗菌薬の適正使用が指導されてきたが、近年では抗菌薬曝露が比較的少ない健常人の市中感染症の起原菌からも耐性菌が分離されるようになり、公衆衛生の見地からも重要な問題となりつつある。これら耐性菌出現の重要な場として近年注目されているのが、動物を含めた様々な環境での菌の耐性化であり、特に、食用動物に対する抗生物質投与による耐性菌の選択とヒトへ感染の可能性が危惧されている。そこで本研究では、ESBL 産生菌による食品汚染に焦点を当て、調査・解析を実施した。153 サンプル中 35 サンプル(22.9%)から 85 株の基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生菌を検出し、そのすべてはトリ肉からの分離であった。ESBL の遺伝子型は輸入トリ肉、国産トリ肉とも CTX-M-2 型が最も多く、また輸入トリ肉由来株では CTX-M-8 型が優位であった。現在、日本の臨床分離株では CTX-M-9 group が主流を占めており、さらに接合伝達性が確認されたトリ肉株のプラスミドのレプリコンタイプも各々異なることから、今回の我々の結果は、食品由来株のヒトへの感染の可能性を否定するものであると考える。しかしながら、現時点では、食品汚染菌が可動性の薬剤耐性遺伝子の供給源となる可能性は否定できておらず、今後も周辺遺伝子の解析を含めた調査・解析が必要と考える。

A. 研究目的

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生菌の分離報告は年々増加傾向にある。特に CTX-M タイプの ESBL 産生大腸菌による市中感染症の増加は 2000 年以降顕著であり、公衆衛生の見地からも重要な問題となりつつある。近年、耐性菌出現の重要な場として注目されているのが、動物を含めた様々な環境での菌の耐性化であり、特に、食用動物に対する抗生物質投与による耐性菌の選択とヒトへ感染の可能性が指摘されている。そこで本研究では、ESBL 産生菌による食品汚染に焦点を当て、調査・解析を実施した。

B. 研究方法

2010 年 1 月から同年 8 月までに 29 の異なるスーパーで購入した食品 153 サンプルを対象とした。サンプル約 10g を brilliant green lactose bile broth にて 24 時間増菌培養したのち、100 μ l を cefotaxime 1 μ g/ml 添加マッコッキー寒天培地に塗布し、一夜培養した。平板上に発育したコロニーについて、菌名同定を

行なうとともに、double disk synergy test による ESBL 産生性のスクリーニング試験、血清型別、ESBL 関連遺伝子の検索、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)解析および Inc type の同定を行なった。

倫理面への配慮 本研究は、名古屋大学医学部生命倫理委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

153 サンプル中 35 サンプル(22.9%)から 85 株の ESBL 産生菌を検出した。ESBL 産生菌はトリ肉からのみ検出され、その分離率は輸入トリ肉の方が国産トリ肉よりやや高い傾向にあった(輸入 57.7% vs 国産 45.2%)。PFGE 解析によりクローナルな関連性がないことが判明した 53 株のうち、52 株が大腸菌、1 株が肺炎桿菌と同定された(Figure 1)。

ESBL 産生大腸菌 52 株のうち、43 株が CTX-M 型、残り 9 株が TEM-もしくは SHV-型の ESBL を産生しており、CTX-M 型では CTX-M-2 型(22 株)が最も多く検出された。こ

の CTX-M-2 型の割合は輸入トリ肉と国産トリ肉との間で有意差は認められなかったが、CTX-M-8 型は輸入トリ肉株で有意に高い傾向(9株中8株)にあった (Table 1)。薬剤感受性試験では cefmetazole、flomoxef、imipenem、amikacin、fosfomycin に高い感受性傾向を示したが、ceftazidime、aztreonam、minocycline に対しては耐性傾向を示していた。

今回、世界的流行株である CTX-M-15 型の O25b:H4-ST131 株は認められなかったものの CTX-M-15 型が 5 株、O25b:H4-ST131 が 4 株あり、そのうち CTX-M-15 株で 4 株、O25b 株では 2 株に接合伝達性が認められた。解析の結果、各々のプラスミドのレプリコンタイプは Inc II- γ が 4 株、Inc F、Inc P が 1 株であった (Table 2)。

D. 考察

今回の調査により、トリ肉からのみ ESBL 産生菌が検出された。このトリ肉における ESBL 産生菌の汚染率は、国内の過去の報告 (Asai et al., 2011. *Acta Vet Scand*; Hiroi et al., 2012. *J Vet Med Sci*) とほぼ一致しているが、欧州の報告 (Dhanji et al., 2010. *J Antimicrob Chemother*; Jouini et al., 2007. *J Antimicrob Chemother*) よりもやや高い傾向にあった。ESBL 型は CTX-M-2 型が輸入トリ肉、国産トリ肉とも最も多く、輸入トリ肉由来株では CTX-M-8 型が優位であった。この結果はトリ肉の輸入元を同じくするイギリスの報告 (Dhanji et al., 2010. *J Antimicrob Chemother*) と類似していたが、オランダの調査 (Overdeest et al., 2011. *Emerg Infect Dis*) とは異なるものであった。現在、日本の臨床分離株では CTX-M-9 group が主流を占めており、今回の結果は食品由来株のヒトへの感染の可能性を否定するものであると考える。一方、オランダなど一部の国では、食品由来株と臨床分離株の ESBL 型が一致しており (Lverstein-van et al., 2011. *Clin Microbiol Infect*)、食品由来株のヒトへの感染を肯定している。この違いはトリ肉の産地や流通機構の差が影響しているかもしれない。今回、接合伝達

性が確認されたプラスミドのレプリコンタイプが、臨床分離株のそれとは異なったことも、食品由来株のヒトへの感染の可能性を否定する結果であるが、本研究では可動性の遺伝子の伝播については解析しておらず、結論を出すには時期尚早といえる。今後は周辺遺伝子の解析を含めた調査が必要と考える。

E. 結論

今回の研究により、トリ肉の ESBL 産生菌汚染が明らかになった。遺伝子型やレプリコンタイプは食品由来株のヒトへの感染の可能性を否定するものであるが、食品汚染菌が可動性の薬剤耐性遺伝子の供給源となる可能性は否定できず、今後も周辺遺伝子の解析を含めた調査が必要と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawamura K., K. Goto, K. Nakane, and Y. Arakawa. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 2013. 11(2):104-10.

2. 学会発表

1) 後藤謙介, 川村久美子, 中根邦彦, 荒川宜親. 健康人糞便由来基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌の細菌学的特徴と食品由来株との比較. 第87回日本感染症学会学術講演会. *感染症学雑誌*. 2013. 第87巻, 238頁

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

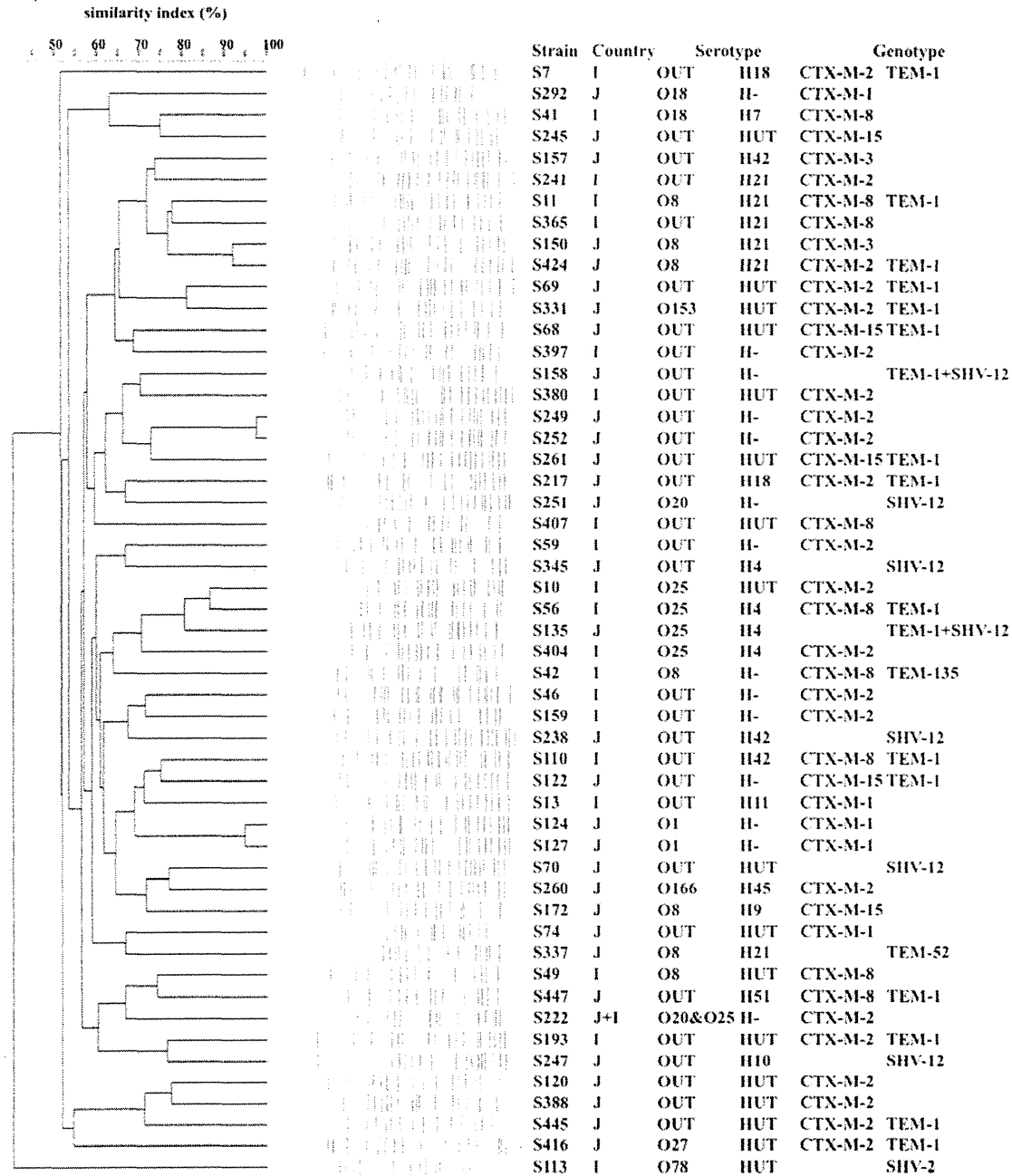
TABLE 1. BREAKDOWN OF GENOTYPES OF 52 ESBLs PRODUCED BY *E. COLI* ISOLATES

<i>Products</i>	<i>CTX-M-1 group (+TEM-1)^{a)}</i>			<i>CTX-M-2</i>	<i>CTX-M-8</i>	<i>TEM-52</i>	<i>SHV (+TEM-1)^{a)}</i>	
	<i>CTX-M-1</i>	<i>CTX-M-3</i>	<i>CTX-M-15</i>	<i>(+TEM-1)^{a)}</i>	<i>(+TEM-1)^{a)}</i>		<i>SHV-12</i>	<i>SHV-2</i>
Domestic products (31)	4	2	5 (3)	11 (6)	1 (1)	1	7 (2)	-
Imported products (21)	1	-	-	11 ^{b)} (2)	8 ^{c)} (3)	-	-	1
Total (52)	5	2	5 (3)	22 (8)	9 (4)	1	7 (2)	1

TABL 2. REPLICON TYPES OF FOUR O25b ISOLATES AND FIVE CTX-M-15-PRODUCING ISOLATES

<i>Sample number</i>	<i>O Serotype^{a)}</i>	<i>Replicon types (patient)</i>	<i>Genotype of ESBL</i>	<i>Replicon types (transconjugant)^{b)}</i>
S10	O25b	I1-γ, N, FIB, F, P	CTX-M-2	P
S56	O25b	I1-γ, FIB, F	CTX-M-8, TEM-1	I1-γ
S135	O25b	I1-γ, FIB, F	TEM-1, SHV-12	ND
S404	O25b	FIB, F	CTX-M-2	ND
S68	OUT	I1-γ, FIB, F	CTX-M-15, TEM-1	I1-γ
S122	OUT	I1-γ, FIB, F	CTX-M-15, TEM-1	I1-γ
S172	O8	FIB, F	CTX-M-15	ND
S245	OUT	F	CTX-M-15	F
S261	OUT	I1-γ, FIB, F	CTX-M-15, TEM-1	I1-γ

FIG. 1 Dendrogram of PFGE pattern among *bla*_{CTX-M}-harbouring *E. coli*
(based on unweighted pair group method with arithmetic averages cluster analysis)



新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 セファロスポリン系薬低感受性を示すペニシリン感性 B 群レンサ球菌に関する研究

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（信州大学大学院医学系研究科・医療生命科学分野・教授
前所属：船橋市立医療センター）

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

セフチブテン(CTB)ディスクで阻止帯を形成しない B 群レンサ球菌(GBS)のほとんどはペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌(PRGBS)であるが、ごく少数ながらペニシリン感性株(PSGBS)も存在する。この研究では CTB ディスクで阻止帯を形成しない PSGBS (CTB⁺PSGBS) の分子学的解析を行った。同一医療機関において 2011 年 5 月～2012 年 1 月の 8 か月間に異なる患者から CTB⁺PSGBS 6 株が検出され、全株が血清型 Ib であった。これらの解析対象株に加え、同期間に検出された血清型 Ib の PRGBS 2 株と PSGBS 1 株を比較に用いた。CTB⁺PSGBS 6 株全てペニシリンとアンピシリンに感性であった。CTB⁺PSGBS 株と PRGBS 株共にセファクロールの MIC は上昇していた(8～16 µg/ml)が、セフチゾキシムの MIC は PRGBS が >32 µg/ml に上昇していたのに対して CTB⁺PSGBS の場合 0.75～1.5 µg/ml とわずかな上昇であった。CTB⁺PSGBS 6 株は PBP2X に T394A、PBP2B に T567I を共有していた。加えて 3 株が PBP2X に G429S、他の 3 株が PBP1A に T145A を保有していた。PRGBS 2 株は PBP2X に A400V とキー置換の V405A 及び Q557E、PBP2B に T567I を共有していた。CTB⁺PSGBS 株は全て ST1 に属していたが、PFGE プロファイルは相互に異なり、また、PRGBS のプロファイルとも異なっていた。PBP2X、2B、1A の連結遺伝子の系統解析の結果、CTB⁺PSGBS と PRGBS のグループは姉妹クレードを形成していた。CTB⁺PSGBS と PRGBS は、一つの祖先型の PSGBS が PBP に異なる組み合わせでアミノ酸置換を獲得することによってそれぞれ独立して出現してきた可能性が考えられる。

A. 研究目的

ペニシリン低感受性 B 群レンサ球菌 (PRGBS)についてはセフチブテン(CTB)ディスクによる簡便なスクリーニングが木村らによって提案されている。我々はこの CTB ディスク周囲に発育阻止帯を形成しない GBS の多くが、ペニシリンの MIC が ≥ 0.25 µg/ml の PRGBS であることを確認している。しかしながら、CTB ディスクで阻止帯を形成しない GBS でペニシリンの MIC が < 0.25 µg/ml のペニシリン感性株(PSGBS)が同一医療機関で 6 株検出された。本研究はこの CTB ディスクで阻止帯を形成しない PSGBS(CTB⁺PSGBS)株 の PBPs 遺伝子や遺

伝的関連性などの解析を目的とする。

B. 研究方法

2011 年 5 月～2012 年 1 月の 8 か月間に同一医療機関で検出された 6 株の CTB⁺PSGBS (B1～B6)を解析対象とした。また、これら 6 株は全て血清型 Ib であったことから比較解析の目的で、当該施設で研究対象期間に検出されている血清型 Ib の PRGBS 2 株(A1、A2)と PSGBS 1 株(B7)を選択した。

CTB ディスク周囲の阻止帯測定は CLSI に従い Kirby-Bauer 法にて実施した。MIC 測定は CLSI の微量液体希釈法により行った。セフチゾキシム(CZX)の MIC 測定には

E テストを用いた。ペニシリン結合蛋白 PBP2X、2B、1A 遺伝子について完全長の塩基配列を決定した。MLST 解析には 7 種のハウスキーピング遺伝子 *adhP*、*pheS*、*atr*、*glnA*、*sdhA*、*glcK*、*tkl* を用いた。また、*SmaI* 消化 DNA の PFGE 解析を行った。PBP2X、2B、1A の連結遺伝子の系統解析を行った。

倫理面への配慮

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

PRGBS 2 株と CTB⁺PSGBS 6 株 はいずれも CTB ディスク周囲に発育阻止帯を形成しなかった。ペニシリンの MIC は PRGBS が 0.5 µg/ml に対して CTB⁺PSGBS は 0.06~0.12 µg/ml と感性であった。セファクロール (CCL) の MIC は PRGBS が 16 µg/ml、CTB⁺PSGBS が 8~16 µg/ml とほぼ同様に上昇していた。CZX の MIC は PSGBS の場合に比較して PRGBS が >32 µg/ml に上昇していたのに対して CTB⁺PSGBS では 0.75~1.5 µg/ml とわずかな上昇であった (Table 1)。

解析株の PBP2X、2B、1A のアミノ酸置換をみると PRGBS 2 株共に PBP2X に A400V 及びキープ置換として確認されている V405A と Q557E が認められた。一方 CTB⁺PSGBS 6 株は PBP2X に T394A を共有しており、加えて B1、B3、B5 の 3 株が G429S、他の B2、B4、B6 の 3 株が PBP1A に T145A を保有していた。また PBP2B には PRGBS と CTB⁺PSGBS が T567I を共有していた (Table 2)。

PFGE 解析の結果、CTB⁺PSGBS の B1~B6 のプロファイルは相互に異なっていた。PRGBS 株の A1 と A2 は同一のプロファイルを示したが、それぞれ外来と入院の患者由来株であった。なお、CTB⁺PSGBS の B1 と PRGBS の A2 は同一患者に由来していた

不明であるが、既報の PRGBS では認められていない。

が PFGE プロファイルは異なっていた。

MLST 解析の結果、PRGBS 2 株と CTB⁺PSGBS 6 株 は全て ST1 と同定された。また、対象とした PSGBS は ST 10 であった。

Figure 1 に PBP2X、2B、1A の連結遺伝子の phylogram に MLST 解析の結果を加えたものを示す。なお解析には既報の R1~R8 及び 1~8 の PRGBS 株、既報の N1~N4 の新生児感染症由来 PSGBS 株及び C1、C2 の成人由来 PSGBS 株も加えた。CTB⁺PSGBS 6 株は一つのクレードを形成し、さらに本研究の A1、A2 と既報の R3、R4 の PRGBS 株で形成されるクレードの姉妹群として位置付けられ、これらの株は全て ST1 に属していた。

D. 考察

PRGBS についてはその出現とその分子学的メカニズムに関する我々の最初の報告以降、米国やカナダからも報告されたがいまだ希である。国内においては我々の後続研究で、GBS の臨床分離株における PRGBS の増加や多剤耐性化傾向、さらにはそのような多剤耐性 PRGBS クローンと院内伝播との関連性などを報告してきている。これら PRGBS 株の殆どが祖先型の genotype である ST1 を含む Clonal complex 1 に属している。

本研究では CTB⁺PSGBS の分子学的特性を調べた。これまでペニシリン感性β溶血性レンサ球菌において CTB ディスク周囲に増殖阻止帯が認められない株や CCL の MIC に上昇が認められる株は報告されていない。CTB⁺PSGBS に共通する PBP2X の T394A と PBP2B の T567I は我々の既報の PRGBS 株に認められているが、これらのアミノ酸置換のβ-ラクタム系薬耐性への関与については不明である。また、PBP2X の G429S は、既報の PRGBS に認められている G429D と同じアミノ酸位の置換である。PBP1A の T145A はトランスグリコシラーゼドメインの置換で CTB 耐性への関与は

CTB⁺PSGBS 6 株の PFGE プロファイルが相互に異なっていたことから、短期間にお

ける単一クローンの院内伝播の可能性は低いものと考えられた。また、これらの CTB'PSGBS 株のプロファイルは同一血清型の PRGBS 2 株のプロファイルとも異なっていた。

興味深いことに CTB'PSGBS の B1 が分離された同じ患者の同種材料から 4 日後に PRGBS の A2 が分離されており、両株は PBP2B に T567I を共有していた。しかしながら PBP2X に共通の置換は認められなかった。我々は当初 CTB'PSGBS が PBP のアミノ酸置換を蓄積することで PRGBS へと変化していくものと推測していたが、このようなアミノ酸置換の結果と PFGE の結果から我々の推測は否定された。MLST 解析で CTB'PSGBS 6 株と PRGBS 2 株が全て ST1 に属していたこと、また系統解析で CTBrPSGBS と PRGBS のグループが姉妹クレードを形成していたことから、CTB'PSGBS と PRGBS は、一つの祖先型の PSGBS が PBP に異なる組み合わせでアミノ酸置換を獲得することによってそれぞれ独立して出現してきた可能性が考えられる。なお、同一患者で 70 日の間隔において CTB'PSGBS が検出されていることからこのクローンの宿主内での安定性が示唆される(データ示さず)。

EUCAST では溶血性レンサ球菌でペニシリン感性の場合、 β -ラクタム系薬に感性と推定されると言及している。CTB や CCL は GBS 感染症の治療薬ではないが、本研究により新しく認識された CTB'PSGBS クローンの存在から、ペニシリン感性の GBS においても PBP のアミノ酸置換や置換位によっては経口セファロスポリンなど他の β -ラクタム系薬の MIC が上昇することが確認された。このことは PBP の置換と β -ラクタム系薬の感受性プロファイルとの関連性を理解するうえで重要であろう。

E. 結論

1. 血清型 Ib に見出された CTB'PSGBS クローンはペニシリン感性でありながら特定のセファロスポリン系薬の MIC が上昇する特異的な薬剤感受性プロファ

イルを示していた。

2. CTB'PSGBS の形成するクレードは PRGBS で形成されるクレードの姉妹群として位置付けられ、これらの株は全て ST1 に属していた。この知見から CTB'PSGBS と PRGBS が、一つの祖先型の GBS が PBP に異なる組み合わせのアミノ酸置換を獲得することで独立して出現してきた可能性が考えられる。
3. CTB や CCL は GBS 感染症の治療薬ではないが、新たに認識された CTB'PSGBS クローンの存在はペニシリン感性の GBS においても PBP のアミノ酸置換や置換位によっては他の β -ラクタム系薬も感性であると推定することが困難な可能性を示している。このことは PBP の置換と β -ラクタム系薬の薬剤感受性プロファイルとの関連性を理解するうえで重要と思われる。

F. 健康危険情報

B 群レンサ球菌は新生児や高齢者における敗血症や髄膜炎等重篤感染症の重要な原因菌のひとつで、ペニシリン系薬剤が治療の第一選択薬となっている。従って治療と医療関連感染対策の観点から今後も継続して PRGBS や多剤耐性 PRGBS、さらには CTB'PSGBS の動向を監視していく必要がある。

なお、米国 FDA は 2013 年 6 月 12 日付連邦官報に PRGBS の存在は将来的に公衆衛生上脅威となる可能性があるという見解を掲載している。また CDC 発刊の Threat Report 2013 でも、PRGBS の存在は分娩時予防投与戦略を脅かし新生児早発型感染症の治療失敗につながる可能性があるという警告している。

G. 研究発表

1. 論文発表

Noriyuki Nagano, Yukiko Nagano, Masami Toyama, Kouji Kimura, Keigo Shibayama, and Yoshichika Arakawa. Penicillin-susceptible group B streptococcal clinical isolates with reduced cephalosporin susceptibility.

Journal of Clinical Microbiology 52:
3406-3410, 2014.

2. 学会発表

- ・ 第41回薬剤耐性菌研究会
セフトリブテンディスクで阻止帯形成
が認められないペニシリン感性 B 群
レンサ球菌の分子学的解析
- ・ 第24回日本臨床微生物学会総会
セフトリブテンディスクで阻止帯形成
が認められないペニシリン感性 B 群
レンサ球菌の分子学的解析

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきもの無し