

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 ESBL 産生大腸菌におけるホスホマイシン耐性機構の解明と 簡易検査法の開発

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・助教）

研究要旨：本研究では、ESBL 産生大腸菌におけるホスホマイシン耐性機構をあきらかにするとともに、その耐性機構を簡易的に識別する検査法を構築した。以前の調査研究から、ESBL 産生大腸菌のうち、5%程度がホスホマイシン耐性を示し、その中にはホスホマイシンを不活化する酵素（以下 FR-GST）を産生する菌株が存在することがあきらかとなっている。そこで、FR-GST を産生する菌株を簡便に識別する検査法を、ディスク拡散試験法を基に構築した。本方法は FR-GST の酵素活性がホスホノギ酸によって阻害されることを利用している。FR-GST 産生株においては、ホスホノギ酸存在下で、ホスホマイシンディスク周囲の阻止円拡大が認められる。本検査法は安価で簡便であるため、細菌検査室においても十分実施可能であると考えられる。

A. 研究目的

近年、ESBL 産生大腸菌による尿路感染症の治療に際し、ホスホマイシン（以下 FOM）の有用性が見直されつつある。しかし、FOM は古くから市販されているため、既に耐性菌が存在することもあきらかとなっている。我々のこれまでの研究により、日本で分離される ESBL 産生大腸菌のうち、5%程度が FOM 耐性であることがあきらかとなっている。そのうち約半数が FOM を不活化する酵素（以下 FR-GST）を産生し、FOM 耐性を獲得していることがわかっている。FR-GST を産生し、FOM 耐性を獲得した大腸菌は、韓国や中国でも確認されており、その広がりが懸念されている。そこで本研究では、FR-GST を産生し、FOM 耐性を獲得した菌株を簡易に識別する検査法の構築を行った。

B. 研究方法

菌株：研究室保存菌株ならびに名大病院で分離された菌株を用いた。

薬剤感受性試験：寒天平板希釈法により FOM の最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。

PCR：FR-GST 遺伝子（*fosA3* 及び *fosC2*）の有無を調べた。

検査法構築：被検菌をミュラーヒントン（MH）培地もしくは MH 培地にグルコース 6 リン酸（G6P）を 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した MH-G6P 培地に塗布した。FOM ディスク（栄研化学）を 2 枚配置し、片方にホスホノギ酸（PPF）

を 1 mg 添加した。1 晩培養し、発育阻止円径を測定した。

倫理面への配慮

該当なし

C. 研究結果と考察

FR-GST を産生する大腸菌 9 株、FR-GST を産生しない大腸菌 16 株、合計 25 株を使用して、FR-GST 産生性を識別する検査法の構築を行った。FR-GST の阻害剤として、本研究では PPF を使用した。PPF の添加量はディスクあたり 1 mg とした（図 1）。

25 株に関する試験結果を図 2 に示す。MH 培地を使用した場合、FR-GST 非産生株については、PPF の添加により FOM ディスク周囲の発育阻止円径の拡大は見られなかった。一方、FR-GST 産生株については 1-4 mm の拡大が認められた。以上の結果から、FR-GST 産生株においては、PPF により発育阻止円径の拡大が観察されたものの、その拡大幅は小さく、PPF の阻害効果は不明瞭であった。

そこで、PPF による阻害効果を明瞭にするために、使用する培地の改良を行った。具体的には、MH 培地に G6P を 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した（以下 MH-G6P 培地）。G6P の添加は菌体内へのホスホマイシンの取り込みを促進するため、より大きな発育阻止円を形成させる。MH-G6P 培地を用いた場合、FR-GST 非産生株

については、MH 培地を使用した時と同様、PPF の添加による FOM ディスク周囲の発育阻止円径の拡大は見られなかった。一方、FR-GST 産生株については 11-14 mm の拡大が認められた。以上の結果から、MH-G6P 培地を用いることで、PPF による阻害効果を明瞭に確認できるようになることがわかった。したがって、MH-G6P 培地、市販 FOM ディスク、PPF を用いることで、FR-GST 産生株を簡便に識別できることがわかった。本試験法では暫定的に cut-off 値を 5 mm と設定した。

日本で市販されている FOM ディスクは FOM の含量が 50 µg、G6P の含量が 5 µg であるのに対し、欧米で市販されている FOM ディスクは FOM の含量が 200 µg、G6P の含量が 50 µg である。そこで、欧米型のディスクを使用し、同様の試験を行った。その結果、欧米型のディスクを使用した場合、MH 培地においても、十分な発育阻止円拡大が確認された（図 3）。

本試験法の実用性を評価するために、名古屋大学医学部附属病院で分離された ESBL 産生大腸菌を用いて追試を行った。細菌検査室において ESBL 産生大腸菌と判断され、かつ、ルーチンの薬剤感受性試験測定において FOM の MIC が >16 µg/mL となった 16 株について評価を行った。寒天平板希釈法による FOM MIC を測定したところ、16 株のうち 12 株が FOM MIC, >128 µg/mL (CLSI の基準で I または R) を示した。この 12 株について、構築したディスク試験法を実施したところ、6 株は陽性、6 株が陰性と判定された。PCR により FR-GST 遺伝子の有無を調べたところ、構築したディスク試験法で陽性と判定された 6 株は FR-GST 遺伝子の保有が確認された。一方、ディスク試験法で陰性と判定された 6 株については、FR-GST 遺伝子の保有は確認されなかった。以上をまとめると、構築したディスク試験法は FR-GST の産生性を確認する方法として有用であると考えられた。

D. 結論

FR-GST を産生し、FOM 耐性を獲得した ESBL 産生大腸菌を識別するディスク試験法を構築した。本試験法は安価で簡便であるため、細菌検査室における日常的な薬剤耐性菌識別法としても導入可能であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文(雑誌)発表

- 1) Nakamura G, Wachino J, Sato N, Kimura K, Yamada K, Jin W, Shibayama K, Yagi T, Kawamura K, Arakawa Y.
Practical agar-based disk potentiation test for detection of fosfomycin-nonsusceptible *Escherichia coli* clincial isolates producing glutathione S-transferases.
Journal of clinical microbiology. 2014, 52(9):

3175-9.

- 2) Wachino J, Kimura K, Yamada K, Jin W, Arakawa Y.

Evaluation of disk potentiation test using kirby-bauer disks containing high-dosage fosfomycin and glucose-6-phosphate to detect production of glutathione S-transferase responsible for fosfomycin resistance.

Journal of clinical microbiology. 2014, 52(10): 3827-8.

2. 学会発表

- 1) 和知野純一, 木村幸司, 荒川宣親.
ESBL 産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易識別法の開発.
第 61 回日本化学療法学会東日本支部総会. 東京. 2014.
- 2) 中村元気, 和知野純一, 佐藤夏巳, 木村幸司, 山田景子, 金万春, 柴山恵吾, 八木哲也, 川村久美子, 荒川宣親.
ESBL 産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易検出法の開発.
第 43 回薬剤耐性菌研究会. 金沢. 2014.
- 3) 和知野純一, 木村幸司, 山田景子, 柴山恵吾, 八木哲也, 川村久美子, 荒川宣親.
ESBL 産生大腸菌における新型ホスホマイシン耐性機構の出現とその簡易検出法の開発.
第 26 日本臨床微生物学会総会. 東京. 2015.

F. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得:出願番号 2014-083319(JP)
ホスホマイシン不活化酵素産生菌の検出
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

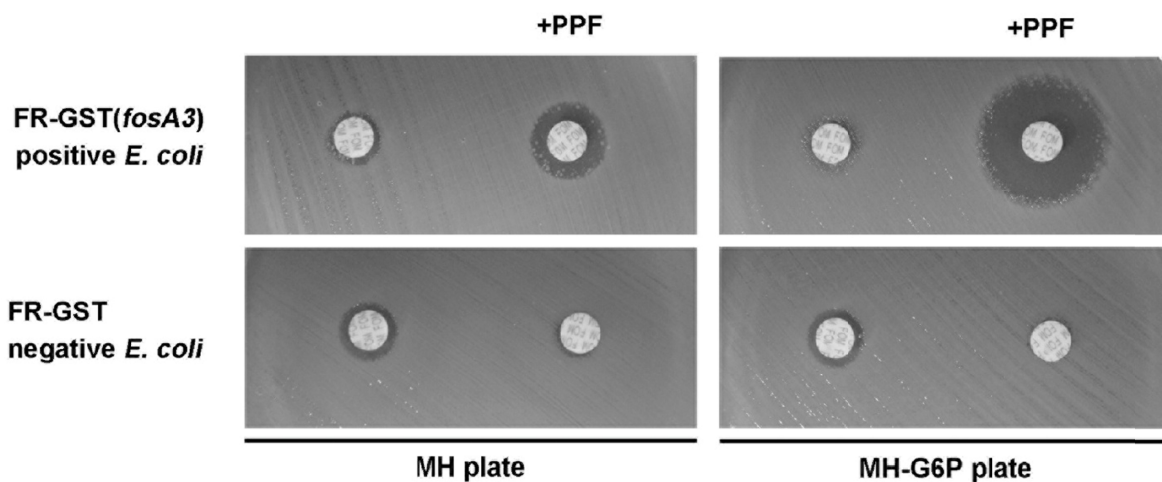


図1. ホスホノギ酸（PPF）添加によるFOMディスク周囲の発育阻止円径の変化

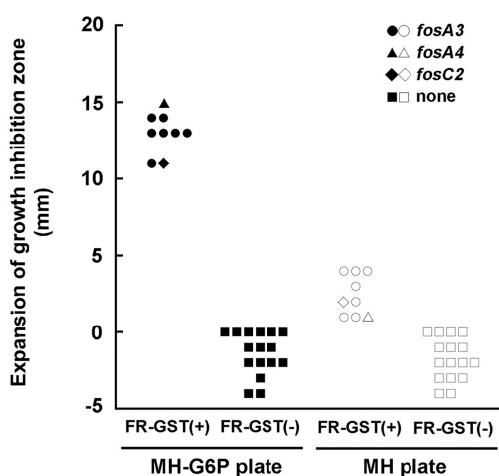


図2. ESBL産生大腸菌25株に関する発育阻止円径の変化（日本で市販されているFOMディスクを使用した場合）

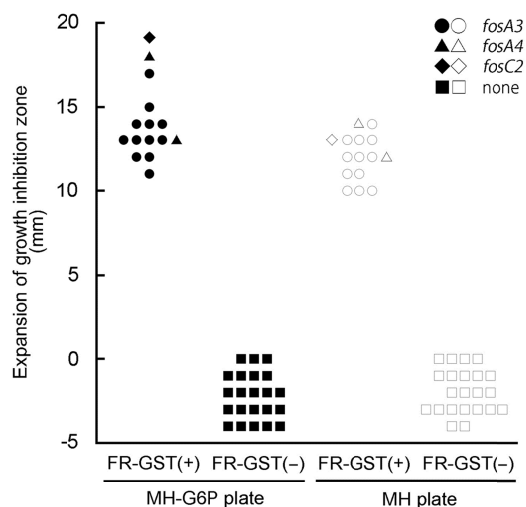


図3. ESBL産生大腸菌37株に関する発育阻止円径の変化（欧米で市販されているFOMディスクの規格で実施）