

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591113

 研究課題名（和文） OXA-型カルバペネマーゼ産生アシネトバクター属菌に関する
集中的・包括的研究

 研究課題名（英文） Intensive and comprehensive study on OXA-type carbapenemase
producing *Acinetobacter* species

研究代表者

石井 良和 (ISHII YOSHIKAZU)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：90246695

研究成果の概要（和文）：アシネトバクター属菌のカルバペネム耐性因子のイムノクロマトグラフィによる検出方法を構築した。本検出システムの感度および特異度はそれぞれ 81.3% および 92.5% であった。このシステムを用いて日本国内で収集された 598 株のアシネトバクター属菌が保有するカルバペネム感受性低下因子について検討した。その結果、*Acinetobacter baumannii* および non-*baumannii* *Acinetobacter* の主要カルバペネム耐性因子は、それぞれ OXA-型カルバペネマーゼおよびメタロβラクタマーゼであった。本邦で分離されたカルバペネム低感受性 *A. baumannii* の 93% は、世界各地から報告されている多剤耐性株と同一 clone 株であることが明らかとなった。さらに、私たちは酵素学的検討が十分になされていない OXA-23 の詳細な酵素学的パラメータの算出および OXA-24 の X-線結晶解析にも成功した。

研究成果の概要（英文）：A detection system for factors that reduce carbapenem susceptibility in *Acinetobacter* species was constructed using an immunochromatographical technique. The sensitivity and specificity of the constructed system were 81.3% and 92.5% respectively. The reduce-susceptibility factors were detected in 598 Japanese clinical isolates of *Acinetobacter* species. OXA-type carbapenemases were detected in *A. baumannii* and metallo-beta-lactamases in non-*baumannii* *Acinetobacter*. Isolates with reduced antibiotic susceptibility belonged to international clone of pandemic multidrug resistant *A. baumannii*. We also succeeded in obtaining X-ray crystal structure data of OXA-24 and the detailed kinetic parameters of OXA-23.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：アシネトバクター属菌、カルバペネマーゼ、耐性菌サーベイランス

1. 研究開始当初の背景

平成 22 年以降、日本でも多剤耐性ア

シネトバクター属菌(MDRA)による院内感染が発生し大きな社会問題となった。しか

し、MDRA の主要カルバペネム耐性因子とされている OXA-23、OXA-40、OXA-51 および OXA-58 といったクラス D に属する臨床検査の現場で使用可能なカルバペネム分解型 β ラクタマーゼ(CHDL)の検出法は確立されていない。また、CHDL に対する有効な抗菌化学療法剤も存在しない。MDRA による感染症の治療は極めて困難である。さらに、MDRA はグラム陰性菌でありながら、乾燥に抵抗し、さらに低温条件においても発育が可能といった性質を有している。そのような背景から、MDRA による院内感染が発生した場合、その制御は極めて困難である。

今後、本邦も欧米諸国と同様の状況になる可能性があると考えられる。その際に迅速かつ簡便に MDRA を検出することができるキットが必要になる。さらに、CHDL に対する阻害剤の開発も必要となる。その為にも、本酵素の詳細な反応機構の解明が必須である。

2. 研究の目的

CHDL は、*Acinetobacter* 属菌のカルバペネム薬耐性に寄与している。CHDL には特異的阻害剤が存在せず、病院微生物検査室で実施可能な検出法がない。したがって、本研究では特異抗体を用いた検出法を構築することとした。*Acinetobacter* 属菌が産生する CHDL の代表酵素として、OXA-23、OXA-24/40、OXA-51 および OXA-58 を選択し、それぞれの大量発現系を構築した。得られた精製酵素を日本白色家兎に incomplete adjuvant と共に免疫し、8 個体の家兎からポリクローナル抗体を得た。得られた家兎ポリクローナル抗体を用いて、イムノクロマトグラフ法による検出システムを構築した。このシステムは特異度が低く、OXA-23 および OXA-51 の検出時に交差反応が認められた。CHDL のポリクローナル抗体による検出は困難なことから、マウスモノクローナル抗体の作成とそれらを用いた検出システムの構築を試みた。

Acinetobacter 属菌が産生する 4 種類の CHDL グループの検出法を構築が終了し、構築した検出法を用いて、全国 72 施設から収集した *Acinetobacter* 属菌を対象として CHDL のスクリーニングを実施した。検出感度・特異度は、イムノクロマト法と、PCR 法による CHDL の遺伝子の保有および発現を比較検討した。その結果、感度/特異度は 90%/100%であり、十分に臨床応用が可能であると考えられた。

本邦は、CHDL 産生 *Acinetobacter* 属菌の検出頻度が低いことから、協力を申し出た 8ヶ国、11 施設の研究者に本検出システムを送付し、各施設においてその評価を行った。

OXA-23 の詳細な酵素学的パラメータは、当教室で構築した測定方法にしがって自記吸光度計を用いて継時的吸光度変化を計測し、そのデータを Michaelis-Menten 式によって解析した。

OXA-23 の結晶は、濃縮してタンパク質濃度 10 mg/ml の精製標品を調整してハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化を行った。結晶化条件のスクリーニングの結果、OXA-23 の結晶を確認した (リザーバ溶液組成 : 0.1 M MES buffer (pH 6.6)、8 %w/v PEG 20000、温度 : 16°C、ドロップ : タンパク質溶液 1 μ L + リザーバ溶液 1 μ L)。

3. 研究の方法

OXA-23 グループ、OXA-24/40 グループ、OXA-51 グループおよび OXA-58 グループの検出システムを 11 施設に送付し、既知の CHDL および CHDL 以外のカルバペネム耐性因子保有 *Acinetobacter* 属菌を対象に、その評価を行った。結果判定は全て各施設の担当者が目視にて行った。

倫理面への配慮

本研究は倫理面に配慮しなければならない研究ではありません。

4. 研究成果

マウスモノクローナル抗体を用いた CHDL 検出キットの構築に成功し、PCR による遺伝子検出結果と相関することを確認した (図 1~図 3)。本年度、海外研究協力者からのデータアップが完了した。感度は 65%~100%、特異度は 60%~100%と施設間差が大きかった。その理由に関しては、各施設とデータ確認および菌株が保有する耐性遺伝子の検証作業を進めている。

図1. 構築したイムノクロマト法によるCHDL検出システム



図2. OXA-型カルバペネマーゼ産生の確認法

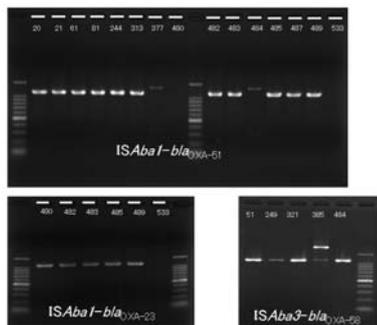
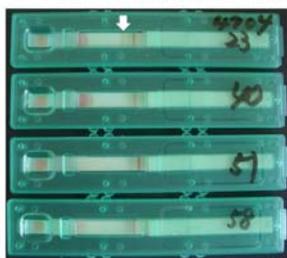


図3. OXA-23産生菌の検出例(矢印が陽性バンド)



OXA-23 の詳細な酵素学的パラメータの取得が終了した。本酵素は、触媒効率が低く薬剤感受性に大きな影響を与えているとは考えられなかった(表1)。

表1. OXA-23の詳細な酵素学的パラメータ

Substrates	K_m or K_i (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
imipenem	N.T.	N.T.	N.T.
meropenem	0.022 ± 0.0020	N.D.	N.D.
cefotaxime	590 ± 30	N.D.	N.D.
ceftazidime	5500 ± 390	n.h.	N.D.
Nitrocefin	56 ± 2.1	$640 \pm 111.2 \times 10^7$	
moxalactam	160 ± 14	n.h.	N.D.
piperacillin	360 ± 36	58 ± 3.6	1.7×10^5

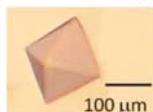
N.T.; not tested

n.h.; no hydrolysis detected

N.D.; not determined

OXA-40 の結晶構造の解析に成功した。OXA-40 の結晶構造は既報の OXA-24 のものと完全に一致した。OXA-23 の結晶解析に関しては図4のように良好な結晶が得られており、現在解析を進めている。

図4. OXA-23の結晶



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Nanjo Y, Ishii Y, Kimura S, Fukami T, Mizoguchi M, Suzuki T, Tomono K, Akasaka Y, Ishii T, Takahashi K, Tateda K, Yamaguchi K. Effects of slow-releasing colistin microspheres on endotoxin-induced sepsis. J Infect Chemother. 査読有 In press (2013)
2. Yoshizumi A, Ishii Y, Livermore DM, Woodford N, Kimura S, Saga T, Harada S, Yamaguchi K, Tateda K. Efficacies of calcium-EDTA in combination with imipenem in a murine model of sepsis caused by *Escherichia coli* with NDM-1 β -lactamase. J Infect Chemother. 査読有 In press (2013)
3. Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T. Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*_{CMY-2} gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. Foodborne Pathog Dis. 査読有 10: 243-249, (2013).
4. Ohno A, Kataoka S, Ishii Y, Terasaki T, Kiso M, Okubo M, Yamaguchi K, Tateda K. Evaluation of Camellia sinensis Catechins as a Swine Antimicrobial Feed Additive that does not Cause Antibiotic Resistance. Microbes Environ. 査読有 28: 81-86, (2013)
5. Maeda T, Saga T, Miyazaki T, Kouyama Y, Harada S, Iwata M, Yoshizawa S, Kimura S, Ishii Y, Urita Y, Sugimoto M, Yamaguchi K, Tateda K. Genotyping of skin and soft tissue infection (SSTI)-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains among outpatients in a teaching hospital in Japan: application of a phage-open reading frame typing (POT) kit. J Infect Chemother. 査読有 18: 906-914, (2012)
6. Mori N, Ishii Y, Tateda K, Kimura S, Kouyama Y, Inoko H, Mitsunaga S, Yamaguchi K, Yoshihara E. A peptide based on homologous sequences of the β -barrel assembly machinery component BamD potentiates antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 査読有 67: 2173-2181, (2012)
7. Kouyama Y, Harada S, Ishii Y, Saga T,

- Yoshizumi A, Tateda K, Yamaguchi K. Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. in Japan: predominance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 and IMP-type metallo- β -lactamase-producing non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *J Infect Chemother*. 査読有 18: 522-528, (2012)
8. Yoshizawa S, Tateda K, Saga T, Ishii Y and Yamaguchi K. Virulence-suppressing effects of linezolid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible contribution to early defervescence. *Antimicrob Agents Chemother*. 査読有 56: 1744-1748, (2012)
 9. Araoka H, Baba M, Tateda K, Ishii Y, Oguri T, Okuzumi K, Oishi T, Mori S, Mitsuda T, Moriya K, Nakamori Y, Ohmagari N, Yamaguchi K, Yoneyama A and ABX Combination Therapy Study Group. In vitro combination effects of aztreonam and aminoglycoside against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 査読有 65: 84-87, (2012)
 10. Sato T, Kawai Y, Matsuda H, Tateda K, Kimura S, Ishii Y, Yamaguchi K and Gotoh N. In vitro and in vivo antibacterial activity of modithromycin against streptococci and *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother*. 査読有 66: 1547-1554, (2011)
 11. Hosono Honda N, Kimura S, Tateda K, Horikawa M, Ueda C, Ishii Y, Ishiguro M, Miyairi S and Yamaguchi K. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* autoinducers and their degradation products, tetramic acids, in bacterial survival and behavior in ecological niches. *Microbes Environment*. 査読有 26: 160-164, (2011)
 12. Harada S, Tateda K, Mitsui H, Hattori Y, Okubo M, Kimura S, Sekigawa K, Kobayashi K, Hashimoto N, Itoyama S, Nakai T, Suzuki T, Ishii Y and Yamaguchi K. Familial spread of a virulent clone of *Klebsiella pneumoniae* causing primary liver abscess. *J Clin Microbiol*. 査読有 49: 2354-2356, (2011)
 13. Sato T, Tateda K, Kimura S, Ishii Y and Yamaguchi K. In Vitro Intracellular Activity and In Vivo Efficacy of Modithromycin, a Novel Bicyclolide, against *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother*. 査読有 55: 1594-1597, (2011)
 14. Sato T, Tateda K, Kimura S, Iwata M, Ishii Y and Yamaguchi K. In Vitro Antibacterial Activity of Modithromycin, a Novel 6,11-Bridged Bicyclolide, against Respiratory Pathogens, Including Macrolide-Resistant Gram-Positive Cocci. *Antimicrob Agents Chemother*. 査読有 55:1588-1593, (2011)
 15. Shimizu-Ibuka A, Oishi M, Yamada S, Ishii Y, Mura K, Sakai H and Matsuzawa H. Roles of residues Cys69, Asn104, Phe160, Gly232, Ser237, and Asp240 in extended-spectrum β -lactamase Toho-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 査読有 55: 284-290, (2010)
 16. Tashiro M, Kimura S, Tateda K, Saga T, Ohno A, Ishii Y, Izumikawa K, Tashiro T, Kohno S and Yamaguchi K. Pravastatin inhibits farnesol production in *Candida albicans* and improves survival in a mouse model of systemic candidiasis. *Med Mycol*. 査読有 50: 353-360, (2011)
 17. Kanayama A, Iyoda T, Matsuzaki K, Saika T, Ikeda F, Ishii Y, Yamaguchi K and Kobayashi I. Rapidly spreading CTX-M-type β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 査読有 36: 340-342, (2010)
 18. Ueda C, Tateda K, Horikawa M, Kimura S, Ishii Y, Nomura K, Yamada K, Suematsu T, Inoue Y, Ishiguro M, Miyairi S and Yamaguchi K. Anti-*Clostridium difficile* potential of tetramic acid derivatives from *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing autoinducers. *Antimicrob Agents Chemother*. 査読有 54: 683-688, (2010)
 19. Nitani Y, Shimamura T, Uchiyama T, Ishii Y, Takehira M, Yutani K, Matsuzawa H and Miyano M. The catalytic efficiency k_{cat}/K_m of the class A β -lactamase Toho-1 correlates with the thermal stability of its catalytic intermediate analog. *Biochim Biophys Acta*. 査読有 1804: 684-691, (2010)

20. Chen Y, Tateda K, Fujita K, Ishii T, Ishii Y, Kimura S, Saga T, Annaka T, Yamada S, Zhao L, Li S, Azuma A, Gemma A, Kudoh S and Yamaguchi K. Sequential changes of *Legionella* antigens and bacterial load in the lungs and urines of a mouse model of pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 査読有 66: 253-260, (2010).
- [学会発表] (計 40 件)
1. Ishii Y, Ohno A, Tateda K, Kashitani F, Yamaguchi K and the Levofloxacin Surveillance Group. Trends in Antimicrobial Susceptibility among Bacterial Isolates from Urinary Tract Infections in Japanese Hospitals Participating in the Levofloxacin Surveillance Group during the Period 1994-2010. 15th International Congress on Infectious Diseases. Bangkok, Thailand. 2012.6.16
 2. 石井良和. 多剤耐性菌への挑戦—ESBL 産生菌の変遷と最新知見—. 第 60 回日本化学療法学会学術集会・第 86 回日本感染症学会総会学術講演会 (Joint シンポジウム). 長崎. 2012. 4. 26
 3. 石井良和. 多剤耐性菌感染症の現状と対策—多剤耐性グラム陰性菌—. 第 43 回日本小児感染症学会総会学術集会 (シンポジウム). 岡山. 2011. 10. 29
 4. 石井良和. 薬剤耐性菌をめぐる諸問題—多剤耐性菌の現状と耐性メカニズム—. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 (シンポジウム). 山形. 2011. 10.27
 5. Ishii Y, Yoshizumi A, Saga T, Harada S, Kuroda M, Igimi S, Yamaguchi K and Tateda K. Characterization of ESBL (Extended-spectrum β -lactamase) producing *Escherichia coli* from patients, students as a healthy human, raw chicken meats and healthy chicken stools. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, USA. 2011. 9. 20
 6. Ishii Y, Mano Y, Saga T, Harada S, Yamaguchi K and Tateda K. National spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST235 and ST357 producing metallo- β -lactamases in Japan. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, USA. 2011. 9. 17
 7. 石井良和. MIC を再考する—1. 基礎的立場から最小発育阻止濃度とブレイクポイントの意味を考察する—. 第 59 回日本化学療法学会総会. 札幌. 2011. 6.24
 8. Ishii Y, Ohno A, Tateda K and Yamaguchi K. Trends in antimicrobial susceptibility among bacterial isolates from UTI of Japanese hospitals participating in the Levofloxacin Surveillance Group during 1994-2010. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) & 27th International Congress of Chemotherapy (ICC). Milan, Italy, 2011.5. 10
 9. Ishii Y, Eto M, Esaki H, Saga T, Harada S, Yoshizumi A, Tateda K, Kuroda M, Igimi S, Rambach A and Yamaguchi K. Characterisation of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from clinical patients, chicken meat and domestic animals. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) & 27th International Congress of Chemotherapy (ICC). Milan, Italy, 2011.5. 8
 10. 石井良和. 耐性菌の基礎から疫学まで—細菌の抗菌薬耐性獲得の妙技—. 第 26 回日本環境感染学会総会 (シンポジウム). 横浜. 2011. 2.19
 11. Ishii Y, Kouyama Y, Fuke A, Tateda K, Harada S, Shibahara Y, Uesaka Y and Yamaguchi K. Novel immunochromatographical detection system for OXA-type carbapenemases. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases. Singapore, Singapore, 2010. 12.3
 12. 石井良和. 「ESBL を基礎と臨床からしつかり学ぶ」1. ESBL とは—薬剤耐性のメカニズム—. 第 59 回日本感染症学会東日本地方会総会・第 57 回日本化学療法学会東日本支部総会 (シンポジウム). 東京. 2010. 10.22
 13. Ishii Y. Is the prevalence of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in Japan increasing? (International Symposium) 13th Annual Meeting of Korean Society of Clinical Microbiology. Seoul, Korea, 2010. 7.8
 14. 石井良和. 耐性菌をめぐる諸課題 ~ 医

療のみの問題か～医療領域における抗
菌薬耐性菌. 第 84 回日本感染症学会総
会 (パネルディスカッション). 京都.
2010. 4.6

〔図書〕 (計 7 件)

1. 石井良和 (分担) 感染症事典 (感染症事
典編集委員会編) 3-17 腸管出血性大腸
菌感染症. P125-127. オーム社. 2012
2. 石井良和 (分担) ガイドラインサポート
ハンドブック 呼吸器感染症 (河野茂編)
2. 必要な細菌学的検査の実施方法と、そ
の解釈 5) 薬剤感受性検査の解釈は?
p92-100. 医薬ジャーナル社. 2011
3. 石井良和 (分担) 小児耐性菌感染症の治
療戦略 (砂川慶介編) 耐性機構 p26-47.
医薬ジャーナル社. 2011
4. 石井良和 (分担) 感染症専門医テキスト
第一部解説編 (社団法人日本感染症学会
編) IV. 化学療法 A. 化学療法の基礎. 6.
耐性機序. P216-221. 南江堂. 2011
5. 石井良和 (分担) 感染症診療の基礎と臨
床～耐性菌の制御に向けて～ (一山智、
山口恵三監修) 2. 耐性因子検出法.
p28-40. 医薬ジャーナル社. 2010
6. 石井良和 (分担) 薬剤師国家試験対策参
考書 7. 病態・薬物治療 (薬学ゼミナ
ール編) 3.1. 感染症、3.2. 抗菌薬の耐性
と副作用. p530-568. 薬学ゼミナール.
2010
7. 石井良和 (分担) 薬剤師国家試験対策参
考書 5. 薬理 (薬学ゼミナール編) 13.1.
抗菌薬 p389-415. 薬学ゼミナール.
2010

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: オキサ型 β -ラクタマーゼ産生菌の検
出方法、同定方法およびキット

発明者: 山口恵三、石井良和、舘田一博、神
山裕一、上原良彦、柴原裕亮

権利者: 山口恵三、石井良和、舘田一博

種類: 特許

番号: 特許第 5124601 号

取得年月日: 平成 24 年 11 月 2 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/med/micro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 良和 (ISHII YOSHIKAZU)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号: 90246695

(2) 研究分担者

舘田 一博 (TATEDA KAZUHIRO)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号: 20236558

(3) 連携研究者

該当なし