

平成 22 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19790400  
 研究課題名(和文) 臨床分離株におけるプラスミド性ニューキノロン耐性遺伝子の分離頻度と薬剤感受性  
 研究課題名(英文) Prevalence of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance gene harboring Gram-negative bacteria isolated from clinical setting in Japan  
 研究代表者  
 山根 一和 (YAMANE KUNIKAZU)  
 国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官  
 研究者番号：00356247

## 研究成果の概要(和文)：

プラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子の分離頻度を調べるために、国立感染症研究所細菌第二部に保存してある大腸菌を対象として PCR 法を用いて耐性遺伝子の保有状況を調べた。2002 年から 2006 年に送付された 751 株を対象とした。PCR 法による検査の結果 *qnr* を保有する菌株は見つからず、*qepA* を保有する菌株は 2 株であった。このことから日本の医療現場から分離されるプラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子を保有する大腸菌はまれである可能性が高い。

## 研究成果の概要(英文)：

Seven hundred fifty-one *Escherichia coli* clinical isolates collected in National Institute of Infectious Diseases from 140 Japanese hospitals between 2002 and 2006 were screened for the *qepA* and *qnr* genes. Two *E. coli* isolates (0.3%) harbored *qepA*, but no *qnr* was identified. The results suggested a low prevalence of *E. coli* harboring *qepA* or *qnr* in Japan.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,000,000	0	1,000,000
2009年度	800,000	0	800,000
総計	3,200,000	0	3,200,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：プラスミド ニューキノロン 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

ニューキノロン系抗菌薬は人工合成された抗菌薬の一つである。点滴製剤が重症感染症に用いられる一方、腸管からの吸収が良好であることから経口剤が様々な感染症の治療薬として用いられ、このため外来などを中心に臨床現場で非常によく使用され、β-ラク

タム剤と同様に感染症治療の大きな柱となる薬剤である。臨床現場での使用量の増加に伴いニューキノロン耐性菌の分離頻度は増加しており、厚生労働省が行っている 2004 年度院内感染対策サーベイランス検査部門の結果では日本の臨床現場で分離される大腸菌の 14%、緑膿菌の 18%がニューキノロ

ン系抗菌薬に対して耐性を示しており問題となっている。

ニューキノロン系抗菌薬は DNA の複製に関与するタンパクである DNA ジャイレース、トポイソメラーゼを阻害することによりその抗菌力を発揮する。従来から報告されているニューキノロン系抗菌薬の耐性機序はこれらの標的タンパクのアミノ酸が変異することすなわち染色体上のタンパクをコードする塩基変異が原因である。また細菌の染色体上にコードされている薬剤排出ポンプの中にニューキノロン系抗菌薬を排出するものがある。ところが、近年プラスミド上にニューキノロン耐性遺伝子がコードされているという報告がなされた (Lancet 1998;351:797-9)。この報告は人工合成された薬剤であるニューキノロン系抗菌薬に対する耐性は染色体上にのみ存在すると考えていた関係者に衝撃を与えた。現在までに 2 種類の耐性遺伝子が報告されている。最初に発見されたプラスミド性ニューキノロン耐性機構は *Qnr* と呼ばれており、DNA ジャイレースに結合してニューキノロンの DNA ジャイレースへの結合を阻害することにより耐性を発揮する。もう一方の耐性機序はアミノグリコシド耐性遺伝子であるアミノグリコシドアセチル化酵素のひとつである AAC(6')Ib-cr がニューキノロンの修飾不活化をおこなう報告である。ノルフロキサシンやシプロフロキサシンなどのピペラジニル基を有するニューキノロンがこの酵素によって不活化され器質特異性がある。

研究者はこれらの 2 種類のプラスミド性のニューキノロン耐性機構とは全く異なる耐性機序を臨床から分離された大腸菌から発見し *QepA* と命名した (Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3354-60.)。この耐性機序はニューキノロンを特異的に排出する薬剤排出ポンプであり、これまでに病原細菌から報告されている薬剤排出ポンプとは異なるアミノ酸配列を持っていることがわかった。また排出能に差はあるものの AAC(6')Ib-cr のような器質特異性は認められない。

プラスミド性ニューキノロン耐性遺伝子を保有する病原細菌の分離頻度は諸外国では算出されているが日本においてはほとんど行われていない。また研究者が発見した耐性遺伝子についても国内外を問わずまだ分離頻度は調べられていない。

## 2. 研究の目的

全国各地の医療施設から分離された薬剤耐性菌を利用してプラスミド性ニューキノロン耐性遺伝子保有菌株の分離頻度を算出する。

## 3. 研究の方法

研究者が所属する国立感染症研究所細菌第二部には全国各地の医療施設から分離された薬剤耐性菌が保存されている。この保存菌株を用いて PCR 法によってスクリーニングを行い、全国の医療機関におけるプラスミド性ニューキノロン耐性遺伝子保有菌株の分離頻度を算出する。

プラスミド性ニューキノロン耐性遺伝子保有菌株はニューキノロン耐性に寄与する割合が低く、臨床分離株から保有菌株をスクリーニングすることは難しい。PCR 法による検出は可能であるが、一般医療機関の検査室レベルでは実施することが難しいため LAMP 法を用いた検出系の確立を目指した。

## 4. 研究成果

2002 年から 2006 年の間に、のべ 140 医療機関から国立感染症研究所細菌第二部に送付された大腸菌は 751 株であった。このうち、325 株に対するノルフロキサシンの最小発育阻止濃度は 0.025 mg/L 未満であった。最小発育阻止濃度が、0.025 mg/L 以上の株、426 株について PCR 法を行ったところ、2 株

(0.3%) が *qepA* 陽性であった。*qnr* 陽性株は認められなかった。今回のスクリーニングで *qepA* 陽性となった株とコントロール株の合計 3 株についてパルスフィールドゲル電位泳動を用いてタイピングしたところ、それぞれ異なるバンドパターンを示し、別のクローンに属すると考えられた。また *qepA* を保持するプラスミドを抽出し EcoRI で切断し電気泳動を行い、切断パターンを比較した。陽性株 1 株とコントロール株のプラスミドは切断パターンが 1 バンド違いで今回見つかった *qepA* 陽性株の *qepA* を保持するプラスミドのタイプは IncFII であることが明らかになった。今回の検討によってプラスミド性ニューキノロン耐性遺伝子保有菌株は臨床分離株の中で非常にまれであることが示唆された。

LAMP 法による検出系はプライマーの設計を行い、現在プライマーの性能を調べているところである。

## 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 1 件)

Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(4):1564-6.

[学会発表] (計 4 件)

Yamane K, Suzuki K, Wachino J, Arakawa Y.

Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes, *qepA* and *qnr*, among *Escherichia coli* clinical isolates in Japan. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. September 2007

山根一和、和知野純一、鈴木里和、木村幸司、柴田尚宏、荒川宜親 日本の臨床現場で分離された大腸菌のプラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子の保有状況 第19回日本臨床微生物学会 2008年1月

山根一和、鈴木里和、荒川宜親 日本の臨床現場で分離された大腸菌のプラスミド性フルオロキノロン耐性遺伝子の保有状況 第82回日本感染症学会 2008年4月

山根一和、鈴木里和、和知野純一、荒川宜親：大腸菌の多剤耐性プラスミド上に存在するフルオロキノロン特異的薬剤排出ポンプ(QepA)の解析 第81回日本細菌学会 2008年3月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根一和

研究者番号：00356247