

19980489

19990478

平成11年度  
厚生科学研究費補助金  
(新興・再興感染症研究事業)

# 細菌の薬剤耐性機構の分子解析 と耐性機序別迅速検出法 に関する研究

研究報告書

平成12年4月

主任研究者 藤原 博

平成11年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

細菌の薬剤耐性機構の分子解析と耐性機序別迅速検出法に関する研究班 班員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	藤原 博	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	室 長
分担研究者	荒川 宜親	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	部 長
	渡辺 治雄	国立感染症研究所 細菌部	部 長
	池 康嘉	群馬大学医学部 微生物学教室 同 薬剤耐性菌実験施設	教 授 施設長
	堀田 國元	国立感染症研究所 生物活性物質部	室 長
	渡邊 邦友	岐阜大学医学部 嫌気性菌実験施設	教 授
	中江 太治	東海大学医学部 分子生命化学教室	教 授
	中島 良徳	北海道薬科大学 微生物学	教 授
	井上 松久	北里大学医学部 微生物学	教 授
	澤井 哲夫 小原 康治	千葉大学薬学部 微生物薬品化学教室 同	教 授 助教授
	山口 恵三	東邦大学医学部 微生物学教室	教 授
研究協力者	八木 哲也	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	
	柴田 尚宏	同 上	
	黒川 博史	同 上	
	柴山 恵吾	同 上	
	蒲池 一成	同 上	
	和田 昭仁	国立感染症研究所 細菌部	
	谷本 弘一	群馬大学医学部 微生物学教室	
	小澤 良之	同 上	
	藤本 修平	同 上	
	野村 隆浩	同 上	
	富田 治芳	同 上	
	石川 淳	国立感染症研究所 生物活性物質部	
	吉良 清子	同 上	
	近藤 信一	(財)微生物化学研究所	
	加藤 直樹	岐阜大学嫌気性菌実験施設	
	山添 喜久雄	同 上	
	中野 厚子	東海大学医学部分子生命科学	
	松岡 眞由美	北海道薬科大学 微生物学教室	
	小林 弘幸	同 上	
	岡本 了一	北里大学医学部 微生物教室	
馬 リン	東邦大学医学部 微生物教室		
大野 章	同 上		
石井 良和	同 上		

分担研究課題 及び 目 次

総合研究報告書（平成11年度） 藤原 博	-----	1
総括研究報告書（平成11年度） 藤原 博	-----	4
分担研究報告書（平成11年度） 荒川 宜親 セフトジジム耐性 <i>Escherichia coli</i> から分離された新しいSHV-24型ESBL	-----	9
渡辺 治雄 VRE型別のための感受性測定法ならびに遺伝子型別法	-----	12
池 康嘉 日本で分離されたバンコマイシン高度耐性腸球菌(VRE)のバンコマイシン耐性 遺伝子(van)の分子遺伝学的研究—人分離VREと輸入鶏肉分離VREの関係—	-----	17
堀田 國元 アミノグリコシド耐性菌の耐性機構の解析と迅速検出に関する研究	-----	22
渡邊 邦友 嫌気性菌におけるカルバペネム耐性菌の迅速検出法の確立	-----	28
中江 太治 薬剤排出ポンプ及びメタロ-β-ラクタマーゼ発現による薬剤耐性株 の迅速検出法の開発	-----	31
中島 良徳 マクロライド耐性機序と耐性菌の迅速検出法	-----	38
井上 松久 β-ラクタム薬加水分解酵素（β-ラクタマーゼ）産生菌の迅速検出法の検討	-----	44
澤井 哲夫 β-ラクタム、マクロライドおよびホスホマイシン耐性菌の迅速検出法、 小原 康治 およびβ-ラクタマーゼのクラス鑑別法の考案	-----	49
山口 恵三 β-ラクタマーゼの迅速検出法の確立に関する研究	-----	55
総括研究報告書（平成10年度） 藤原 博	-----	61
分担研究報告書（平成10年度）	-----	65
総括研究報告書（平成 9年度） 藤原 博	-----	104
分担研究報告書（平成 9年度）	-----	107
-----		
特許申請書	-----	144
研究発表等リスト	-----	162
主要な論文別冊	-----	166

## II. 総括研究報告書（平成11年度）

## 細菌の薬剤耐性の分子解析と耐性機序別迅速検出法に関する研究

主任研究者 藤原 博 (国立感染症 細菌・血液製剤部)

### 研究要旨

平成9-11年度の3年間の重点研究の最終年度として、とりまとめる研究を行った。本研究では、国内各地の医療施設から臨床分離される主要な薬剤耐性菌の耐性機構の分子解析とその研究成果を応用し、迅速検出法などの確立を試みた。平成11年度に実施された、分担研究課題を以下に示す。①IMP-1メタロ-β-ラクタマーゼを産生する緑膿菌やセラチアなどのグラム陰性桿菌を簡便に識別するキットの試作。(藤原、荒川)②セフトジジム(CAZ)耐性*E. coli*から国際的にも新規なSHV-24型ESBLを確認。(荒川)③アルベカシン(ABK)耐性黄色ブドウ球菌において、メチシリン耐性遺伝子(*mecA*)とABK耐性遺伝子(*aac(6)/aph(2'')*)を、PCR法により簡便に検出する方法を確立。(堀田)④β-ラクタマーゼの迅速検出法の確立に関する研究。(山口)⑤イミペネム耐性を示す*B. fragilis*におけるIS様エレメントの分布状況の調査。(渡邊邦友)⑥VRE型別のための感受性測定法ならびに遺伝子型別法の検討。(渡辺 治雄)⑦β-ラクタム薬加水分解酵素(β-ラクタマーゼ)産生菌の迅速検出法の検討。(井上)⑧薬剤排出ポンプ及びメタロ-β-ラクタマーゼ発現による薬剤耐性株の迅速検出法の開発。(中江)⑨マクロライド耐性機序と耐性菌の迅速検出法。(中島)⑩日本で分離されたバンコマイシン高度耐性VREのバンコマイシン耐性遺伝子の分子遺伝学的研究。(池)⑪β-ラクタム薬、マクロライド、ホスホマイシン耐性菌の迅速検出法の検討など。(小原)

臨床現場の日常的な検査業務の中で実施可能な検査法としては、メルカプト化合物を利用したメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の識別キットが試作され、現在、評価のためのデータ取りが行なわれている。

### 分担研究者

荒川 宜親	国立感染症研究所	部長
渡辺 治雄	国立感染症研究所	部長
池 康嘉	群馬大学医学部	教授
堀田 國元	国立感染症研究所	室長
渡邊 邦友	岐阜大学医学部	教授
中江 太治	東海大学医学部	教授
中島 良徳	北海道薬科大学	教授
井上 松久	北里大学医学部	教授
小原 康治	千葉大学薬学部	助教授
山口 恵三	東邦大学医学部	教授

### A. 研究目的

1940年代にペニシリンの工業的大量生産に成功して以降、1970年代から我が国は、様々な抗菌薬の開発において世界をリードしてきた。その結果、優れた抗菌作用を示す新しい抗菌薬を臨床で用いる事が可能となり、細菌感染症の治療は著しく進歩した。しかし、1980年代に入るとMRSAをはじめ種々の薬剤耐性菌による院内感染症や術後感染症が世界的な規模で問題となり、現在、薬剤耐性菌による感染症は医療現場において大きな脅威として浮上しつつある。特に、我が国では、欧米で未だ一般的ではない多数の「新薬」が臨床使用されており、また、それ

らは比較的自由に用いることができるため、欧米では未だ出現していないような新種の薬剤耐性菌が出現しつつある。これらの薬剤耐性菌による院内感染症や術後感染症に対し適切に対処するには、臨床材料等から分離される細菌がどのような薬剤耐性を獲得しているかを迅速かつ簡便に識別する事が不可欠となっている。本研究では、主要な耐性菌や新しく発見された耐性菌における薬剤耐性機構の分子解析を通じて、臨床的に問題となる種々の薬剤耐性菌を迅速かつ簡便に検出する方法の確立をを目指した。

### B. 研究方法

#### 1. IMP-1メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の簡易識別法

IMP-1などのメタロ-β-ラクタマーゼは亜鉛原子を酵素活性に必要とするため、酵素の活性中心に-SH基などが多数露出している。これらに対し強力な相互作用を示すメルカプト化合物を含むdiskとセフトジジム(CAZ)diskを用いて、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を簡便に識別できることを発見し、それを応用して識別キットを試作した。(荒川、藤原)

#### 2. CAZ耐性*Escherichia coli*から分離された新しいSHV-24型ESBL

1996年千葉県内の医療施設に入院中の患者の尿からCAZ耐性*Escherichia coli*が分離されたため、耐性遺伝子のクローニング等によりその耐性機構を解明

した。(荒川)

### 3. アミノグリコシド耐性菌の耐性機構の解析と迅速検出に関する研究

MRSA感染症の治療薬として用いられているアルベカシン(ABK)に耐性を獲得したMRSAから、*mecA*と*aac(6)/aph(2)*遺伝子を同時にPCR法により検出する方法を確立した。具体的には、被検菌のコロニーから爪楊枝の先で菌を極少量採取し、2種類の遺伝子を検出可能な混合プライマーを用いたPCR法により、2つの耐性遺伝子を確実に検出することが可能な条件等を検討した。(堀田)

### 4. $\beta$ -ラクタマーゼの迅速検出法の確立に関する研究

我が国で臨床分離される細菌は、基質特異性の異なる多様な $\beta$ -ラクタマーゼを産生し、それにより $\beta$ -ラクタム薬への感受性も大きく異なり、選択すべき $\beta$ -ラクタム薬も大きく異なっている。これらの耐性菌がどのタイプの $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を保有しているかを迅速検出するため、PCR法とSouthern blotを組み合わせて、各種 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を迅速に検出する方法及び識別法を検討した。(山口)

### 6. VRE型別のための感受性測定法ならびに遺伝子型別法の検討

臨床分離される腸球菌のうち、バンコマイシン(VCM)に耐性を示すVREにおける感受性測定法やVCM耐性遺伝子(*vanA*, *vanB*, *vanC*など)の型別法について検討を行った。具体的には、PCR、multiplex PCR、蛍光プローブを用いたPCRなどを用いて遺伝子を識別した。(渡辺 治雄)

### 7. $\beta$ -ラクタム薬加水分解酵素 ( $\beta$ -ラクタマーゼ)産生菌の迅速検出法の検討

臨床分離される細菌が産生する $\beta$ -ラクタマーゼの型を判別するため、PCaseTESTによる迅速診断法を検討した。また、PCR法によりクラスB型 $\beta$ -ラクタマーゼを検出するIPM濃度を設定した。(井上)

### 8. 薬剤排出ポンプ及びメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ発現による薬剤耐性株の迅速検出法の開発

細菌が各種の抗菌薬に多剤耐性を獲得する機構の一つとして薬剤排出ポンプが関与していることが明らかとなっている。また、緑膿菌におけるカルバペネム耐性はOprDポーリンの減少が関与している。そこで、薬剤排出ポンプやOprDポーリンの発現状況を加熱処理緑膿菌と特異抗体を用いて検出する方法を検討した。また、IMP-1メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの抗

体を用いてIMP-1を検出する方法を検討した。(中江)

9. マクロライド耐性機序と耐性菌の迅速検出法  
キャピラリーPCR法などを用いて黄色ブドウ球菌からのマクロライド耐性遺伝子(*erm*, *msrSA*, *mphBM*など)の検出法を検討した。(中島)

### 10. 日本で分離されたバンコマイシン高度耐性VREのバンコマイシン耐性遺伝子の分子遺伝学的研究

国内で分離されたVREについて、PFGEやサザンブロット法などにより、その分子遺伝学的関連を解析した。また、輸入鶏肉や人から分離されるテイコプラニン(TEIC)低感受性の*vanA*型VREにおける遺伝子変異部位の解析を行った。(池)

### 11. $\beta$ -ラクタム薬、マクロライド、ホスホマイシン耐性菌の迅速検出法の検討

臨床分離菌からPCR法により、マクロライド耐性遺伝子(*ereA*, *ereB*, *mphA*, *mphB*, *ermA*, *ermB*, *ermC*など)やホスホマイシン耐性遺伝子(*fosA*)を検出する方法を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、臨床材料などから分離された細菌について研究を行ったが、人由来の血液や臓器そのものは取り扱わず、倫理面で特に問題となる研究課題は無かった。

## C. 研究結果

### 1. IMP-1メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の簡易識別法

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを強力に阻害する2-メルカプトプロピオン酸、メルカプト酢酸などを染み込ませたdiskを用いて、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を簡便に識別する方法を確立した。方法としては、NCCLSの方法により被検菌をミューラーヒントン寒天培地に塗布した後、CAZのdiskを4~5cm間をあけて置き、さらにその1方の近傍(約2cm)にメルカプト化合物の原液を2~3  $\mu$ g/ml添加し、一夜培養し、翌日判定する。この方法により、PCRを用いずにメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌か否かを識別することが可能となる。(図1)この方法は、荒川と感染研で特許申請し、本法を応用した検出キットを(株)栄研科学に試作させ、特異性や感度などについて調査・解析を行っている。(荒川、藤原)

### 2. CAZ耐性*Escherichia coli*から分離された新しいSHV-24型ESBL

CAZ耐性*E. coli*から耐性に関与する遺伝子をクローニングしシーケンス解析や酵素学的な解析を行った結果、SHV-1と比較した場合、179番目のDがGに1カ所のみ変異したSHV-derived ESBLに属する新しいSHV-型ESBLであることが判明した。この研究結果を記載した論文を米国微生物学会(ASM)の学術

雑誌(AAC)に投稿したところSHV-24という識別番号が付与された。(荒川)

### 3. アミノグリコシド耐性菌の耐性機構の解析と迅速検出に関する研究

43株のABK耐性菌(MRSAを含む)のコロニーから爪楊枝の先で菌を極少量採取し、加熱処理しDNAを抽出し、*mecA*と*aac(6)/aph(2)*遺伝子を同時に検出できる2種類の混合PCRプライマーを用いたPCR法を確立した。これにより、黄色ブドウ球菌がMRSAであることとABK耐性遺伝子を保有しているか否かを同時に判定することが可能となった。(堀田)

### 4. $\beta$ -ラクタマーゼの迅速検出法の確立に関する研究

各種 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の迅速検出法を確立する為、PCR法とSouthern blotを組み合わせた検出系を構築し、臨床材料から分離された菌株に応用した。その結果、Western blotとして高い感度が得られ、タンパクレベルでは検出できなかった菌株からも $\beta$ -ラクタマーゼをコードする遺伝子が検出された。

また、クロキサシリンやクラブラン酸、オキサシリンなどの $\beta$ -ラクタマーゼ阻害作用を持つ物質と $\beta$ -ラクタム環を持つ発色色素であるニトロセフィンなどを組み合わせることにより、菌が産生する $\beta$ -ラクタマーゼがクラスA, B, C, Dのいずれに属するかを概ね判別することが可能となった。(山口)

### 5. イミペネム耐性を示す*B. fragilis*におけるIS様エレメントの分布状況の調査。

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを産生しイミペネムに耐性を獲得した*B. fragilis*におけるIS-様エレメントの存在をPCR法により解析した結果、CfiA型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの遺伝子(*cfiA*)とIS-様エレメントは密接に関連しており、特に、*cfiA*遺伝子が発現しイミペネムに耐性を獲得するには、*cfiA*遺伝子の上流にIS-様エレメントが存在し、その中に存在するプロモーター活性により*cfiA*遺伝子が発現される必要があることが示唆された。(渡邊邦友)

### 6. VRE型別のための感受性測定法ならびに遺伝子型別法の検討

国内で分離された腸球菌やVRE、およびATCCから供与されたVREを用いて、NCCLS寒天平板法、Etest(AB Biodisk, Sweden)、センシディスク(BBL, USA)により感受性試験を行った結果、VanAとVanB型VREの型別は可能であったが、VanCと感受性株の区別は不可能であった。

また、蛍光プローブ法による*van*型別やPCRによる菌種の同定法は実用上可能である事が確認された。

(渡辺 治雄)

### 7. $\beta$ -ラクタム薬加水分解酵素( $\beta$ -ラクタマーゼ)産生菌の迅速検出法の検討

市販のPCaseTESTでは、クラスC $\beta$ -ラクタマーゼの多量産生株では、偽陽性反応が問題であったが、MCIPCを用いた改良型PCaseTESTとCFPMのMICを組み合わせる事によりESBLs、クラスA $\beta$ -ラクタマーゼ、クラスC $\beta$ -ラクタマーゼを分別し検出することが可能となった。また、PCR法によりクラスB型 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の存在を検出する場合、被検菌を選択する培地のIPM濃度は、緑膿菌では64 $\mu$ g/ml以上、セラチアでは8 $\mu$ g/ml以上、肺炎桿菌や大腸菌で1 $\mu$ g/ml以上であることが確認された。(井上)

### 8. 薬剤排出ポンプ及びメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ発現による薬剤耐性株の迅速検出法の開発。

細菌の膜に存在する薬剤排出ポンプを構成する蛋白やOprDポーリン蛋白に対する特異抗体を用いた検査法により、迅速に耐性菌の識別が可能であった。

また、IMP-1型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼに対する特異抗体を用いた検出法により、IMP-1産生株が効率良く検出できた。(中江)

### 9. マクロライド耐性機序と耐性菌の迅速検出法

黄色ブドウ球菌のマクロライド、リンコサマイド、ストレプトグラミンB耐性において薬剤の汲み出しに関わる遺伝子として*msrSA*を新しく発見した。また、マクロライド不活化遺伝子*mphBM*をマクロライド耐性ブドウ球菌が保有する事を新しく発見した。臨床分離されるマクロライド耐性ブドウ球菌177株について解析した結果、*erm*遺伝子の保有率は95%以上であったが、*msrSA*遺伝子の保有率は3.6%、*mphBM*遺伝子の保有率は、極めて低く1株のみであった。(中島)

### 10. 日本で分離されたバンコマイシン高度耐性VREのバンコマイシン耐性遺伝子の分子遺伝学的研究

国内で人または輸入鶏肉、鶏糞などから分離された15株の*vanA*型VREについて解析を行った。その中で人由来の3株とタイから輸入された鶏肉由来の3株が、VCM高度耐性-TEIC低感受性という特異な耐性傾向を示したため、分子遺伝的解析を行ったところ、*van*遺伝子クラスターの*vanS*遺伝子に3箇所共通の変異が見られ、人由来株と輸入鶏肉由来株の起源が同じである可能性が強く示唆された。(池)

## 11. $\beta$ -ラクタム薬、マクロライド、ホスホマイシン耐性菌の迅速検出法の検討

$\beta$ -ラクタマーゼの各クラスに対する阻害剤を用いる事により、各クラスの鑑別が簡便かつ迅速に行える方法を考案した。また、臨床分離された500株の大腸菌のうち、マクロライド耐性に関わる*ereB*遺伝子を保有する株が3株確認された。また、*mphA*遺伝子も3株で確認された。一方、*S. marcescens*で*fosA*遺伝子を保有するものが確認された。(小原)

### D. 考察

本研究班は、平成9年度から平成11年度の3年計画で、研究を進めてきたが、平成10年の研究により、SHV-5-2a型ESBL (SHV-12)を産生するCAZ耐性*K. pneumoniae*の存在を国内ではじめて確認した。さらに、SHV-24と命名された新規ESBLも世界ではじめて確認された。既に、我が国における予備的調査により、Toho-1型 $\beta$ -ラクタマーゼを産生する*E. coli*やSHV-12を産生する*K. pneumoniae*が各地から分離されており、これらを日常の検査業務の中で識別する検査法の確立が求められている。

一方、セファマイシンやカルバペネム薬など臨床で賞用されている広域 $\beta$ -ラクタム薬を分解するため問題となりつつあるIMP-1型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を、PCR法などの高価な検査法を用いることなく簡便に識別する方法の確立が求められていた。

本研究により、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの強力な阻害剤である、メルカプト化合物を用いたディスク拡散法を開発し、検査室で実施可能なPCRにかわる試験法がほぼ実用化された。

また、MRSA感染症に効果が期待できる数少ない抗菌薬の一つであるABKに対し、耐性を付与する二機能酵素遺伝子 (*aac(6)/aph(2'')*)を保有する株を*mecA*遺伝子と同時に検出できるPCR法が考案された。その他耐性遺伝子をPCR法により検出する方法が多数検討され、特異度や感度など十分に実用に耐える方法が構築された。しかし、コストや手間の面を考慮すると、細菌検査室の一般的な日常業務の中で実施することは、かなり困難でありそれにかわる、簡便かつ安価な検出・検査法の確立が必要となっている。

薬剤耐性の機序の分子解析に関する研究も様々な耐性菌に対し幅広く行われた。特に、TEICに対し低感受性を示す*vanA*型VREについて、臨床分離株と鶏肉由来株の双方に関し解析が行われ、*vanS*遺伝子内に3ヵ所の共通変異を発見し、人から分離される

TEIC低感受性*vanA*型VREの起源が輸入鶏肉である可能性を明らかにした事は、国民の健康の増進に貢献する事を目的とした厚生科学研究の重要な成果の一つと考えられる。

その他、実用化途上の研究も多数見られ、今後の発展が期待される。PCR法や酵素-抗体を用いた試験法など、高価な高度技術を用いる検査法の考案や確立は比較的容易であるが、医療施設の検査室の日常業務において実施可能な、簡便で安価な試験・検査法の確立には、各々の耐性菌における耐性機構を十分熟知した上に、アイデアや工夫が必要であり困難な部分も多いが、薬剤耐性機構の解明に取り組む研究者には、その研究成果を実用的な検査法の確立にまで昇華させる視点での努力も必要であり、今後の健闘が期待される。

様々な薬剤耐性菌の出現と蔓延は、21世紀の医療を脅かす要因の中で最も大きなものとなる事が懸念されており、公衆衛生上重要な問題としての認識に立ち、厚生省としてこの領域の研究を推進し積極的に発展させるための持続的な支援体制の強化が不可欠となっている。

### E. 結論

11名の主任研究者とその研究協力者らにより平成9~11年度の3年度にわたり、 $\beta$ -ラクタム薬、アミノ配糖体、グリコペプチド、マクロライドなど主要な抗菌薬に対する耐性機構の分子解析とそれぞれの耐性菌を検出・識別する様々な方法が研究された。

その結果、国内ではじめて欧米の医療施設で増加し問題となっている、拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ(ESBLs)を産生する*E. coli*や*K. pneumoniae*が確認された。また、SHV-24と命名された新規のESBLを産生する*E. coli*も発見された。

一方、我が国で最初に確認され、最近では海外でも分離されるようになった、IMP-1型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを産生する緑膿菌やセラチアをPCR法など高価な方法を用いずに簡便に識別できる試験法が確立され、試験キットとして試作品が完成し、臨床現場で予備試験が開始された。また、この検査法の原理と方法について特許が出願された。

その他、PCR法などを用いた様々な試験検査法が考案され、その特異度や感度も十分に実用に耐える事が報告され他。しかし、コストや手間、機器の面で日常的な検査業務で実施するにはさらなる改良や改善が必要なものも多く、今後の継続的研究が必要な

ものも多く残っている。

#### F. 研究発表等

1. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, Goto M. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J Clin Microbiol. 2000 Jan;38(1):40-43.
2. Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. FEMS Microbiol Lett. 2000 Mar 1;184(1):53-56.
3. Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. Lancet. 1999 Sep 11;354(9182):955.

#### G. 特許出願等

発明の名称：メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の判別  
方法

発明者：荒川宜親、後藤正文

特許出願番号：特願平11-26897号

特許申請者：荒川宜親および国立感染症研究所

### Ⅲ. 分担研究報告書（平成11年度）

## セフトジジム耐性*Escherichia coli*から分離された新しいSHV-24型ESBL

主任研究者 藤原 博 (国立感染症研 細菌・血液製剤部)  
分担研究者 荒川 直親 (同上)

### 研究要旨

国内で臨床分離された大腸菌(*Escherichia coli*)で、第三世代セフェム薬であるセフトジジム(CAZ)に高度耐性(MIC, >128  $\mu$ g/ml)を示す株におけるCAZ耐性に関わる遺伝子を解析した。その結果、これまでに欧米などから分離され、その遺伝子やアミノ酸の情報が明らかとなっている基質拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ(Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: 略してESBL)の中で、SHV-由来ESBLに属する新しいSHV-型 $\beta$ -ラクタマーゼであることが明らかとなった。

この新型 $\beta$ -ラクタマーゼは、SHV-24と命名され、179番目のアミノ酸がD(アスパラギン酸)からG(グリシン)に置換された結果、酵素の活性部位を構成する $\Omega$ -ループ構造内の水素結合が形成されず、活性中心へのCAZの侵入と固定が、容易となることで、CAZの加水分解活性が高まったと考えられる。

同様の1アミノ酸変異が見られるSHV-由来ESBLとしてSHV-6やSHV-8が既に報告されているが、新しく発見されたSHV-24は、それらと同じグループに分類されると考えられる。

研究協力者： 柴田尚宏、黒川 博史、八木 哲也  
柴山恵吾、蒲池 一成  
(感染症研：細菌・血液製剤部)

### A. 研究目的

我が国では、1980年代から、各種のグラム陰性桿菌に広い抗菌活性を示す、セフトキシム(CTX)やセフトジジム(CAZ)などの第三世代セフェム薬が細菌感染症の治療薬として広く用いられてきた。これらの抗菌薬は、現時点でも肺炎桿菌や大腸菌などに抗菌活性が期待できるものの、一部には耐性菌の出現が報告されている(1)。それらの産生する $\beta$ -ラクタマーゼを解析した場合、多くはToho-1型の $\beta$ -ラクタマーゼ(2)やAmpC型セファロスポリナーゼ、あるいは、IMP-1型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ(3)などであり、欧米で広がりつつある、TEM-由来またはSHV-由来の拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ(ESBL)はこれまで確認されていなかった。しかし、昨年我々の研究から、国内にもSHV-12型ESBLを産生する肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)や、大腸菌(*E. coli*)が存在することが明らかになっている(4)。

本研究では、国内に他の種類のESBL産生菌が存在するか否かについて調査・研究を実施した。

### B. 研究方法

#### 1. CAZ耐性菌の感受性試験の再検査

1996年6月に、千葉県内の一医療施設の患者の尿からCAZ高度耐性(MIC, >128  $\mu$ g/ml)を示す*E. coli* HKY453株が分離されたため、その薬剤感受性を再

検査し、CAZのMIC値が>128  $\mu$ g/mlであることを確認した。

#### 2. CAZ耐性菌からのESBL遺伝子の検出

CAZ耐性のHKY453株をLB培地を用いて、10<sup>7</sup> CFU/ml程度の菌数まで培養した。培養後、DNAを煮沸法により抽出し、定法によりPCRを用いて遺伝子の検出を行った。用いたプライマーセットを図1に示す。

#### 3. CAZ耐性に関与する遺伝子のクローニング

HKY453株の培養液1.5mlから、菌体を回収し定法に従い、DNAの抽出を行った。抽出したDNAをBamHIで切断し、同様の制限酵素処理をしたクローニングベクターpBCSK+とライゲーションさせた。その後、*E. coli* XL1-Blue細胞に導入し、CAZ耐性遺伝子のクローン化を行った。また、このクローンを用いて、薬剤感受性試験を実施した。

#### 4. 遺伝子の塩基配列の決定

PCR産物とクローン化したプラスミドを鋳型として、ダイターミネーター法により塩基配列の決定を行った。シークエンスの方法と用いたプライマーセットを図2に示す。

#### 5. 酵素学的解析

クローンから酵素を精製し、kinetic parametersを定法に従い測定した。

### C. 研究結果

#### 1. 感受性試験結果

親株である*E. coli* HKY453およびそのクローンの

薬剤感受性試験結果を表1に示す。

CAZの*E. coli* HKY453に対するMIC値は、128  $\mu$ g/ml以上であったが、そのクローンに対するMIC値は、128  $\mu$ g/mlと低下した。また、他の第三世代セフェム薬であるセフトキシム(CTX)や第一世代セフェム薬であるセファゾリン(CEZ)のMIC値は4  $\mu$ g/mlと低かった。この結果、この酵素は、CAZのみを特異的に効率良く分解する酵素であることが示唆された。

## 2. PCR解析による耐性遺伝子の特定

CAZ耐性*E. coli* HKY453株やそのクローンからはSHV-由来ESBLに特異的PCRプライマーにより、DNA断片が増幅された。その結果、この株におけるCAZ耐性にはSHV-由来ESBLの産生が関与していることが強く示唆された。

## 3. CAZ耐性遺伝子のクローン化と塩基配列の決定

CAZ耐性のクローン*E. coli* XL1-Blue(pSHV001)の感受性試験結果を表1に示す。また、PCR産物とpSHV001を鋳型にして行った、ダイターミネーター法による遺伝子の解析結果から推定したアミノ酸配列を他の近縁のESBLと比較して図3に示す。

新しく発見されたSHV-24は、1箇所のみ179番目のDがGに置換していた。

## 4. 酵素活性の解析結果

SHV-24のkinetic parametersを表2に示す。この酵素に対し、CAZは高い親和性を示し、酵素の活性中心に容易に接近・固定される事が示唆される。しかし、分解反応速度はそれほど高くなく、ゆっくりとしかも確実にCAZを分解する事が示唆された。CTXやCEZは親和性も低くしかも分解速度も非常に低いことが示唆された。

## D. 考 察

今回、国内で分離されたCAZ耐性の臨床分離大腸菌から、SHV-24と命名された新しい SHV-derived ESBLが、はじめて確認された。これまで、国内で検出されるCTX耐性*E. coli*などは、殆どがToho-1型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であり、これらをESBL産生菌としている報告も多いが、欧米で多数報告されている、TEM-、SHV-由来ESBLは、我々が昨年度実施した研究結果が出るまではこれまで確認されていなかった。今回の調査により、国内にもSHV-12型ESBL産生菌以外にも新型のESBLを産生する菌株が国内に存在していることが確認された。この事実により、わが国でも、この種のESBL産生菌の検出も

念頭に置いた、耐性菌の検出や、薬剤感受性試験とその判定を行うことが必要となっている。しかし、NCCLSの推奨する基準に従った場合、欧米と比べ、我が国では第三世代セフェム薬に耐性を示す臨床分離菌の割合が高くなっているなどの特別な状況も見られるため、ESBL以外のクラスA型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌や、AmpC型  $\beta$ -ラクタマーゼの過剰産生株などがESBL産生菌として誤判定される事の無いよう、より精度の高い検査法の開発が必要となっている。

我が国では、第三世代セフェム薬以外にセファマイシンやカルバペネムなどの広域  $\beta$ -ラクタマーゼを産生するグラム陰性桿菌も各地の医療施設から分離されており、特にIMP-1型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを産生するセラチアや緑膿菌も数%程度の割合を示しつつある。したがって、これらの増加を防ぐため、セファマイシンやカルバペネムの使用を制限した場合、我が国でもESBL産生菌の増加が引き起こされる可能性もあり、十分な注意が必要となっている。

## E. 参考文献

1. Y. Ishii et al., Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:2269-2275, 1995.
2. T. Yagi et al., Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like  $\beta$ -lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:2606-2611, 1997
3. 荒川直親、 $\beta$ -ラクタマーゼの機能分類と分子分類、日本細菌学雑誌 54:639-649, 1999
4. T. Yagi et al., A preliminary survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett.* 184:53-56, 2000
5. Kurokawa H, et al., Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Lancet* 354(9182):955, 1999

表1 感受性試験結果

strain	MIC (µg/ml)														
	AMP <sup>a</sup>	PIP	CER	CFZ	CFP	CAZ	CAZ+CVA	CTX	CPM	CMZ	CMX	MOX	ATM	SUL+CFP	IPM
<i>E. coli</i> HKY453	>128	>128	16	4	8	>128	4	4	16	1	1	8	4	1	<0.5
<i>E. coli</i> XL1-Blue (pSHV001)	>128	>128	8	4	4	128	1	2	8	1	0.5	2	1	0.5	<0.5
<i>E. coli</i> XL1-Blue	2	2	1	1	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

<sup>a</sup> Abbreviations: AMP, ampicillin; PIP, piperacillin; CER, cephaloridine; CFZ, cefazolin; CFP, cefoperazone; CAZ, ceftazidime; CAZ+CVA, ceftazidime and clavulanic acid (4 µg/ml); CTX, cefotaxime; CPM, ceftiofur; CMZ, cefmetazole; CMX, cefminox; MOX, moxalactam; ATM, aztreonam; SUL+CFP, sulbactam and cefoperazone (1:1); IPM, imipenem.

表2 SHV-24のカイネティックパラメーター

β-lactam antibiotic	kinetic parameter				
	$V_{max}$ <sup>a)</sup> (µM/min)	$K_m$ (µM)	$V_{max}/K_m$	Relative $V_{max}/K_m$	$K_i$ <sup>b)</sup> (µM)
AMP	2.00	32	0.0625	100	57
CER	2.37	210	0.0113	18.1	ND <sup>c)</sup>
AZT	0.735	500	0.00147	2.35	ND
CAZ	0.043	30	0.000143	0.23	37

a) Calculated with 5.46 µg of purified SHV-24.

b)  $K_i$  was calculated by using clavulanic acid.

c) ND, not done

図1 PCR及びシーケンス解析用プライマーと塩基配列の決定方法

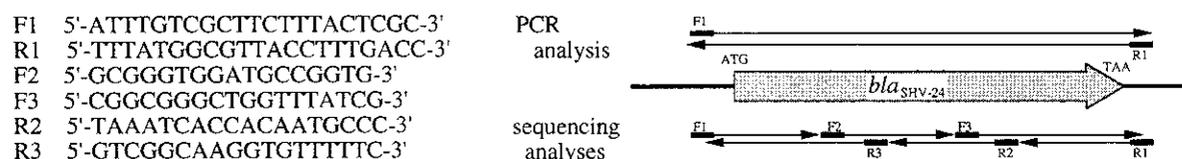


図2 SHV-24で見られた179番目のアミノ酸の置換

SHV-1, SHV-2	1	520	530	540
SHV-3, SHV-4	atg-----	ggcga	gccccgc	accactacc
SHV-5, ---	M	-	G D A R D T T T P A	
	1		179	
SHV-24		ggcga	gccccgc	accactacc
		G D A R	G T T T P A	
SHV-6		ggcga	gccccgc	accactacc
		G D A R	A T T T P A	
SHV-8		ggcga	gccccgc	accactacc
		G D A R	N T T T P A	

分担研究報告書

VRE 型別のための感受性測定法ならびに遺伝子型別法  
分担研究者 和田昭仁、渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌部

**研究要旨** バンコマイシン耐性腸球菌を臨床検体からスクリーニングし、型別する方法に関して検討した。6 mg/L バンコマイシン含有 BHI プレートに生育した腸球菌の Van 型別を行うには、MIC を測定する必要がある。ディスク法では VanC の型判別を行うことができないためである。高精度に型別を行うには、PCR, multiplex PCR, 蛍光プローブを用いた PCR などの方法により遺伝子型別する必要がある。院内感染防止手段を取るための情報を迅速に病院に与えるには、各検査室で実施可能な型別方法を確立しておく必要がある。

**A. 研究目的**

欧米においては、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）による院内感染は、1989 年より増加の一途をたどっており、その危険因子として、バンコマイシンを含む複数の抗生剤の前投与、重篤な基礎疾患、免疫抑制状態、開腹手術などが、指摘されている。ヨーロッパにおいては、養鶏に成長促進剤として投与されていた、アポパルシンが VRE 出現を招いたとの考え方が受け入れられているが、アメリカにおいては、この添加剤が認可されていないにもかかわらず VRE 感染の増加傾向が見られており、治療薬として使われているバンコマイシンの大量使用が VRE の分離率増加に寄与していると考えられている(1, 2)。本邦においては、輸入食鳥からの VRE の検出が報告される一方(3)、バンコマイシンの使用量も顕著に増大しており(4)、近いうちに、VRE が、院内感染起炎菌として高率に分離されるようになることが危惧される。

1999 年 4 月 1 日から施行された感染症新法に VRE 感染症は 4 類、全例報告疾患として挙げられている。VanA, VanB の検出方法に関しては、感染症研究所ホームページに記載があるが、この法律に伴う通知(5)の中で報告義務があるとされているバンコマイシン中等度耐性(MIC, 8 mg/L)の

VanC/vanC の VRE 感染症(vanC VRE が無菌部位から検出された場合)に関して、その検査、型別法に関しての具体的な方法はまだ示されていない。われわれは、過去 2 年間にわたる班研究の成果として、一般の細菌検査室でも実施可能な VRE のスクリーニング、検出、同定、遺伝子型別方法を示してきた。今回の報告では、感受性測定で VanC 型別が可能かどうかを検討した結果と、遺伝子型別の手法の一つとして開発した蛍光プローブをもちいた PCR による VRE 同定方法に関して報告する。

**B. 研究方法**

**使用菌株とその同定法**

標準菌株として、*Enterococcus faecium* ATCC51559 (vanA), *E. faecium* FN1 (vanA, 池博士より分与), *E. faecalis* ATCC51299 (vanB), *E. faecium* BM4339 (vanD, Dr. P. Courvalin より分与)(6), *E. faecalis* ATCC29212 (wild type) を、また、臨床分離 *E. faecium* (vanB) 2 株、*E. gallinarum* (vanC-1) 21 株、*E. casseliflavu/flavascens* (vanC-2/3) 22 株、バンコマイシン感受性 *Enterococcus* (VSE) 25 株を用いた。臨床分離菌の同定には、ストレプトグラム(テルモ株式会社、東京)と、用手法による運動性の検査をおこなった。臨床より分離された

菌は、バンコマイシン 6 mg/L 含有 BHI 培地 (Difco, MI, USA) に塗布後、35 度、一晚培養をおこない、コロニーを形成した菌を検査対象とした。

#### 感受性測定

NCCLS 平板法、Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden), センシディスク (BBL, MA, USA) により感受性測定をおこなった。

#### 蛍光プローブによる遺伝子検出

遺伝子型別を行うために、以下の方法で菌から DNA を抽出した。コロニーを、0.1 ml の 100 mg/L mutanolysin (Sigma, MO, USA) を含むバッファーに McFarland 1 程度にけん濁後、37 度、30 分インキュベート、その後、DNA Extraction Reagent (PE Biosystems, CA, USA) を等量加え、95 度で、10 分インキュベートしたのち、細胞残さと、イオン交換樹脂を遠沈、上清 2 µl を PCR のテンプレートとして用いた。vanA, vanB, vanC-1, vanC-2/3, vanD, *E. faecalis* ddl (*ddlfaecalis*), *E. faecium* ddl (*ddlfaecium*), *Enterococcus* 16S rDNA の各々に対して、DNA データベースから、Primer Express (PE Biosystems) ソフトウェアの助けを借りて、プライマーと、プローブを設定した。すべてのプローブは、5' を FAM (reporter dye) で、3' を TAMRA (quenching dye) でラベルした。蛍光の検出は ABI PRISM 7200 (PE Biosystems) をもちい、マニュアルにしたがって PCR 前後の蛍光強度を比較した。陽性と陰性の判断基準は 99.9% に設定した。全反応量 25 µl 中には、1 X TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、各プライマー 800 nM、各プローブ 400 nM が含まれている。PCR の条件は、50 C 2 分、95 C 10 分の Hold のあと、95 C 15 秒、63 C 1 分の 2 ステップ PCR を 30 回行った。

### C. 研究結果

#### 感受性測定

表 1 に示すように、ディスク法では、VanA, VanB の型別は可能であったが、VanC と VSE の区別は不可能であった。一方、Etest をもちいた方法では、すべての VSE は、バンコマイシン 3 mg/L 以下の

感受性を示し、VanC との区別が可能であった (表 2)。また、Etest ではテイコプラニンの感受性測定結果とあわせて、VanA, VanB の判定が可能であった (表 2、3)。

前年度の報告書では、ATCC51299 (*vanB*) の感受性が、VITEK では正しく判定できなかったことを報告したが、現在、VITEK には、バンコマイシン 6 mg/L 含有ウェルが、新しくもちいられており、*vanB* のバンコマイシン感受性は正しく判定された。ただし、これは菌種同定が正しいことが前提である。

#### 蛍光プローブによる van 型別

最初に、標準菌株から、proteinaseK、phenol 処理にて抽出した、DNA を template として、van 型別と *E. faecalis*, *E. faecium* の *ddl* 検出をおこなったところ、*vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2/3* すべてが正しく判定され、*van* 遺伝子を持たない、*E. faecalis* ATCC29212 は、*van* 増幅は陰性であった。また、*ddlfaecalis*, *ddlfaecium* も正しく判定された。つぎに、標準菌株の菌体から、mutanolysin をもちいて、研究方法の項で記述した方法により抽出した DNA をテンプレートとして、遺伝子型別を行ったところ、精製 DNA と同様に、すべて正しく判定された。

#### PCR による菌種同定

前年の報告書で述べたように、*Enterococcus* 属の同定には、市販キットが簡便であるが、*E. faecalis*, *E. faecium* と、*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*/*E. flavascens* を同定するには、キットで得られる情報以外に、運動性検査が必要である (特に、*E. faecium* と *E. gallinarum* の鑑別同定)。しかし、実際には、これらの方法をもちいても、運動性の判定が不可能であったり、キットのスコアに載っていない糖分解性を示すため、同定不可能な菌が存在する。これらの同定不能株のうちから無作為に 15 株を選び、菌体から mutanolysin によって抽出した DNA をもちいて、*van* 型別を行ったところ、*vanC-1* 10 株、*vanC-2/3* 3 株、VSE 2 株であり、*ddlfaecalis*, *ddlfaecium* の

増幅検知により、*E. faecalis*、*E. faecium*の同定も可能であった。

#### D. 考察

VREとして、現在報告されている型は、*vanA* (*E. faecalis*, *E. faecium* and others)、*vanB* (*E. faecalis*, *E. faecium* and others)、*vanC-1* (*E. gallinarum*)、*vanC-2/3* (*E. casseliflavus*/*E. flavescens*)、*vanD* (*E. faecium*)がある。このうち、欧米、本邦で院内感染の起炎菌として、報告されているものは、*vanA*と*vanB*に限られている(6, 7)。したがって、本邦においても、これらの遺伝子を持つVREと、*vanC*のVREを区別することが、院内感染対策上必要であるが、ディスク法感受性検査だけではこの区別ができない。たとえば、I (intermediate)の判定(阻止円直径15-16 mm)が、*vanC*とVSEにみられるため、この方法だけで、中程度から高度耐性を示す*vanB*と、*vanC*を区別することは困難である(表1、文献8)。また、自動測定法のひとつとして、広く用いられているVITEKは、*vanC*の菌の運動性を(-)と入力すると(実際にこう判定されることがある)、実際はMIC 8 mg/Lとなるべきところ、*vanA*または*vanB*をもつ*E. faecalis*、*E. faecium*の感受性測定結果として、>32 mg/Lの値を返してしまう。逆に、*E. faecalis* (*vanB*)の運動性を(+)と入力すると、MIC <0.5の値を返す。このように、自動測定機器では、感受性測定以前の同定が、重要である。以上の結果より、無菌部から検出された腸球菌が、バンコマイシン 6mg/L含有培地に生えた場合は、Etestをもちいてバンコマイシン、テイコプラニンのMICを測定することが必要であると考えられた。これに加え、実施可能であれば遺伝子型別情報提供は院内感染防止に有用である。前年度の報告書で示した、multiplex PCRは*vanA*、*vanB*、*vanC-1*、*vanC-2/3*を一つのチューブで増幅、アガロースゲル電気泳動では一つのウェルで検出する便利な方法であるが、これを成功させるためには、テンプレートDNAを高度に精製する必要がある。このため、実際には、報告までの迅速性

が損なわれることがあった。この問題を改善するために、今回は、検出に蛍光プローブをもちいる方法を*van*型別に導入した。これは、通常のPCRにもちいるプライマーにくわえ、蛍光色素で標識したPCR産物の配列特異的なプローブをもちい、特異的増幅により、蛍光色素がプローブから遊離し、蛍光強度が増加する現象を検出することにより、増幅の有無をみる方法である。この方法の利点は、1) 高度にテンプレートDNAを精製することなしに、多検体を、同時に短時間で処理できる。2) チューブの蓋を開けないで、PCRの有無を蛍光強度の差としての検出ができるため、carry-over contaminationが起こる可能性を減少させることができる(TaqMan Universal PCR Master Mixには、dUTPとuracil glycosylaseが使われているため、これもcarry-over contaminationの防止に寄与する)。3) 今回の検査法には、過去に行ってきた、*vanA*、*vanB*、*vanC-1*、*vanC-2/3*にくわえ、*ddlfaecalis*、*ddlfaecium*、*Enterococcus* 16S rDNAを検出する系をふくめた。これにより、*vanA*、*vanB*の検出頻度が高い菌種の同定を、*van*型別と同時に行えるようにした。4) まだ、outbreakを起こした報告はないが、*vanD*の菌は、その感受性(5)から、院内感染起炎となりうると考えられるため、*vanD*も同時に検出できるようにした。欠点は、必要な機器と試薬が高価なことである。しかし、迅速性、同定確立を考えると、院内感染対策を実際に効果的に行うことができる病院には、導入する価値のあるものであると考えられる。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 参考文献

1. H. Kirst, D.G. Thompson and T.I. Nicas. 1998. Historical yearly usage of vancomycin. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1303-1304 (Letter to the editor).
2. H. C. Wegener. 1998. Historical yearly usage of glycopeptides for animals and

- humans: the American-European paradox revisited. 42:3409 (Letter to the editor).
3. 野村隆浩、谷本弘一、池 康嘉 1999. 食肉より分離された高度バンコマイシン耐性腸球菌について. 日本細菌学雑誌 54:201.
  4. 平松啓一 1998. *in abstract of VRE(バンコマイシン耐性腸球菌)フォーラム*, 東京.
  5. 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 法令・通知・関係資料一、中央法規出版株式会社、1999.
  6. B. Perichon, P. Raynolds and P. Courvalin. 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2016-2018.
  7. J.G. Morris Jr., D.K. Shay, J.N. Hebben, R.J. McCarter Jr., B.E. Perdue, W. Jarvis, J.A. Johnson, T.C. Dowling, L.B. Polish and R.S. Schwalbe. 1995. Enterococci resistant to multiple antimicrobial Agents, including vancomycin. *Annals Intern. Med.* 123:250-259.
  8. P.C. Kohner, R. Patel, J.R. Uhl, K.M. Garin, M.K. Hopkins, L.T. Wegener and F.R. Cockerill III. 1997. Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion and automated Vitek methods for testing susceptibility of *Enterococcus* spp. to vancomycin. *J. Clin. Microbiol.* 35:3258-3263.

表 1

genotype	Vancomycin disk inhibitory zone diameter (mm)								total
	<15	16	17	18	19	20	21	>22	
<i>vanA</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>vanB</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>vanC-1</i>	0	7	9	3	1	1	0	0	21
<i>vanC-2/3</i>	0	8	9	0	0	4	0	1	22
<i>vanD</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
VSE	0	4	10	3	1	0	3	1	22

表 2

genotype	Vancomycin MIC measured by Etest (mg/L)									
	<0.5	0.75-1	1.5-2	3-4	6-8	12-16	24-32	48-64	>96	total
<i>vanA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
<i>vanB</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3
<i>vanC-1</i>	0	0	0	0	21	0	0	0	0	21
<i>vanC-2/3</i>	0	0	0	12 <sup>a</sup>	10	0	0	0	0	22
<i>vanD</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
VSE	2	6	10	7 <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	25

a, all strains showed 4 mg/L; b, all strains showed 3 mg/L

表 3

genotype	Teicoplanin MICs measured by Etest (mg/L)									total
	<0.5	0.75-1	1.5-2	3-4	6-8	12-16	24-32	48-64	>96	
<i>vanA</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
<i>vanB</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>vanC-1</i>	12	9	0	0	0	0	0	0	0	21
<i>vanC-2/3</i>	9	13	0	0	0	0	0	0	0	22
<i>vanD</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
VSE	22	2	0	0	0	0	0	0	0	25

# 日本で分離されたバンコマイシン高度耐性腸球菌 (VRE) の バンコマイシン耐性遺伝子 (*van*) の分子遺伝学的研究 —— 人分離VREと輸入鶏肉分離VREの関係 ——

分担研究者 池 康嘉

研究協力者 谷本弘一、小澤良之、藤本修平、野村隆浩、富田治芳  
(群馬大学医学部微生物学教室)

## 研究要旨

1996年以来日本で人から分離されたVREは4地域8人の患者から分離された。これらの人分離VREのバンコマイシン耐性遺伝子の分子遺伝学的解析を行った。また同時に行った輸入鶏肉由来VREの分子生物学的解析結果との比較を行った。調べたVREは日本の4地域8人から分離された8株、輸入鶏肉から分離された5株、日本の鶏舎糞便由来VRE2株である。調べたVREはすべて*vanA*遺伝子をもつVREであった。人分離VREのうち2地域3人から分離された3株のVREは*vancomycin*高度耐性、*teicoplanin*低感受性で野生型のVanA型VREの示す*vancomycin-teicoplanin*高度耐性と異なる耐性値を示した。輸入鶏肉分離VREはタイ国産3株、フランス産2株である。このうちタイ国産3株はすべて*vancomycin*高度耐性、*teicoplanin*低感受性であった。VanA型遺伝子の中でglycopeptideに対するsensor蛋白の遺伝子である*vanS*遺伝子のDNA塩基配列を調べた結果、*vancomycin*高度耐性、*teicoplanin*低感受性VREはすべて同一部位の3ヶ所の塩基に変異があることが解った。このことは、日本の2地域3人から分離されたVREとタイ国産鶏肉のVREのVanA型*vancomycin*耐性遺伝子の起源が同じである可能性を示唆している。さらに一般に鶏由来VREの*van*遺伝子と人VREの*van*遺伝子の関連性を示唆するものである。

## A. 目的

日本において*vancomycin*耐性腸球菌 (VRE) は、1996年以来4地域(A, B, C, D地域) 8人 (A, 1人; B, 4人; C, 2人; D, 1人) の患者から分離されている。又輸入鶏肉の1998年度のVRE調査では、タイ国産、フランス産鶏肉からそれぞれ20%、30%の頻度でVREが分離され合計5株のVREが分離されている。国内の*avoparcin*使用中あるいは使用歴のある複数の鶏農場由来の鶏肉を調査した結果では、国内鶏肉からはVREは分離されていない。又国内鶏由来糞便中のVREの調査では養鶏場の糞便から全部で2株のVREが分離されているがVREが国内の鶏糞便中に選択的に増加している証拠はない。

今回、これまで日本で分離された人由来VREの遺伝学的、分子生物学的解析を行い同時期に行った輸入鶏肉由来VREとの関連性を考察する。

## B. 材料と方法

用いた菌株。野生型又は標準型 VanA VREとして

*E. faecium* BM4147を使用。*E. faecium* BM4147はフランスの臨床分離株で*vanA* geneはplasmid pIP816 (34kb)上のトランスポゾンTn1546(10.851kb)に存在し、最も詳しく解析されている。臨床分離バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)。日本の4地域(A, B, C, D)から8人から分離された8株 (A, 1株; B, 4株; C, 2株; D, 1株) を使用。このうちB, 4株は*vancomycin*, *teicoplanin*高度耐性VREのプロトタイプのVanA型VREであるため、*E. faecium* EF2 1株のみを使用した(表1)。その他の比較のために使用したVREは表1に示した。

用いた培地。菌の生育にはTodd Hewitt broth (Difco)を用いた。薬剤耐性検査、Muller Hinton medium(Difco)を用いて薬剤寒天平板を作製した。方法はNCCLS法に従った。

Plasmid DNAの分離。アルカリ溶解法に従った。Southern Hybridization、Pulsed field gel electrophoresis、PCR法、塩基配列の決定等は前報に従った。

C. 結果

1) 日本で分離されたVREのglycopeptide耐性

1996年以来日本において人、養鶏場糞便、輸入鶏肉からVREが分離されている。人分離VREは1人1株として、日本の4地域8人の患者から分離された8株。養鶏場糞便分離VREは2株、輸入鶏肉分離VREは5株(タイ3株、フランス2株)である。これらのVREのglycopeptide耐性値は人分離

VREのうち2地域3人から分離された3株はすべてvancomycin高度耐性、teicoplanin低感受性であった。これらの菌のglycopeptide耐性値はタイ産鶏肉及び国内養鶏場糞便分離VREの耐性値と類似であった。すなわちタイ輸入鶏肉分離VRE3株すべて、日本の鶏糞便分離株2株、合計8株がvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性であった(表1)。これらの株はvancomycinとteicoplaninが存在する寒天培地の方が、teicoplaninのみ含む寒天培地の時より、teicoplanin耐性(MIC値)が高値を示した。

2) VRE DNAとVREのplasmid DNAの解析

VRE DNAのSmaI断片のpulsed field gel electrophoresisの結果を図1に示す。調べた人由来VREはすべてDNAのSmaI断片のpulsed field gel electrophoresisの型が異なっていた。また人由来VREと輸入鶏肉及び鶏糞便由来VREとも異なっていた。VREから分離されたplasmid DNAのEcoRI断片のagarose gel electrophoresisの結果を図2に示す。この結果、VREはそれぞれ異なるplasmidを含んでいることが解った。これらの結果から調べたvancomycin高度耐性teicoplanin低感受性VREはそれぞれ異なる菌株であることが解った。

表1 Mutation of vanS Gene of VanA type Vancomycin Resistant Enterococci (VanA VRE)

Class	Strain	Origin (Area)	Source or specimen	Drug resistance level (MIC, µg/ml)		Nucleotide sequence of vanS gene
				Vancomycin	Teicoplanin	
Wild type or prototype	<i>E. faecium</i> BM4147	France	human	high	high	
	<i>E. faecium</i> FN1	Japan(A)	human	256	128	
	<i>E. faecium</i> EF2	Japan(B)	human	512	128	
Mutation of one nucleotide	<i>E. faecalis</i> C47	France	chicken	512	128	
Mutation of three nucleotide	<i>E. faecium</i> KV12	Japan(C)	human	high	low	
	<i>E. faecium</i> KV5	Japan(C)	human	1024	8	
	<i>E. faecium</i> CV1	Japan(D)	human	512	4	
	<i>E. duran</i> Y43	Thai	chicken	256	2	
	<i>E. faecalis</i> Y46	Thai	chicken	512	8	
	<i>E. faecalis</i> Y55	Thai	chicken	512	32	
	<i>E. faecalis</i> CB26	Japan	chicken feces	512	4	
	<i>E. faecalis</i> KM22	Japan	chicken feces	512	8	

図1 Pulsed Field of Gel Electrophoresis of VRE DNA

