

平成12年度
厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

新型の薬剤耐性菌のレファレンス
並びに耐性機構の解析及び
迅速・簡便検出法に関する研究

研究報告書

平成13年4月

主任研究者 池 康 嘉

平成12年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
 新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法
 に関する研究班 班員名簿

区分	氏名	所 属	職 名
主任研究者	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
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
	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
	井上松久	北里大学医学部微生物学	教授
	生方公子	明治製菓(株)薬品総合研究所 市中感染症研究室 微生物化学研究所	客員研 究部長
	後藤直正	京都薬科大学薬学部微生物学	助教授
	中江太治	東海大学医学部分子生命科学部門	教授
	堀田國元	国立感染症研究所生物活性物質部遺伝生化学室	室長
	山口恵三	東邦大学医学部微生物学教室	教授
	山本友子	千葉大学薬学部薬効・安全性学講座 微生物薬品化学研究室	教授
	和田昭仁	国立感染症研究所細菌部日和見感染細菌室	室長
	渡邊邦友	岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設	教授

研究協力者	谷本弘一	群馬大学医学部 微生物学教室	
	藤本修平	同上	
	富田治芳	同上	
	小澤良之	同上	
	柴田尚宏	国立感染症研究所 細菌・血液製剤部	
	土井洋平	同上	
	柴山恵吾	同上	
	黒川博史	同上	
	柴崎有美	明治製菓(株)薬品総合研究所	
	千葉菜緒子	同上	
	長谷川恵子	同上	
	砂川慶介	北里大学医学部感染症学講座	
	石川 淳	国立感染症研究所生物活性物質部	
	土崎尚史	同上	
	石井良和	東邦大学医学部微生物学教室	
	田中香お里	岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設、青森県立中央病院	

分担研究課題及び目次

総括報告書 (平成 12 年度)	
池 康嘉	新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び 迅速・簡便検出法方に関する研究 ----- 1
分担研究報告書 (平成 12 年度)	
荒川宜親	カルバペネム耐性緑膿菌から分離された VIM-2 型メタロ- β -ラクタマーゼ ----- 8
池 康嘉	バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の耐性機構の研究と レファレンス及び VRE の拡散原因 ----- 12
中江太治	MexEF-OprN ポンプの発現を制御する mexT 遺伝子の野性株 緑膿菌における変動に関する解析 ----- 16
後藤直正	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (緑膿菌)の新規マルチコンポーネント 型排出システム MexX-MexY の OprM との共同作業並びに抗菌 薬自然耐性への貢献 --- 22
和田昭仁	グリコペプチド耐性黄色ブドウ球菌の検出方法と耐性遺伝子 検査技術の開発 --- 26
山本友子	新型のマクロライド耐性グラム陰性菌の耐性機構の解析および 迅速・簡便検出法方に関する研究 --- 29
井上松久	耐性機構の解析及び簡便検出法に関する研究 ----- 31
生方公子	呼吸器感染症から分離される肺炎球菌およびインフルエンザ菌 における耐性メカニズムの解析とその迅速診断法に関する研究 --- 34
堀田国元	アミノグリコシド耐性菌のレファレンス因子の特定と迅速簡 便検出法に関する研究 ----- 51
渡邊邦友	無芽胞嫌気性グラム陰性桿菌の抗菌薬耐性化とその耐性機構の 解析第一報 <i>Fusobacterium</i> 感染症とのその抗菌薬耐性の現況 --- 57
山口恵三	各種 ESBL 検出のシステムの比較検討に関する研究 ----- 60

班会議抄録	64
主な論文別冊	80

I. 総括研究報告書（平成 12 年度）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

総括研究報告書

新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法に関する研究

主任研究者 池 康嘉（群馬大学医学部微生物学教室）

研究要旨 平成 12 年度は本研究課題による研究班の初年度の研究となる。
①緑膿菌の多剤耐性で最も治療困難な院内感染原因菌はメタロ-β-ラクタマーゼ生産によるβラクタム耐性菌である。新型メタロ-β-ラクタマーゼ生産緑膿菌の分離とその耐性遺伝子の研究を行った（荒川）。②臨床分離大腸菌、肺炎桿菌の拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）の中で TEM 型 ESBL を検出しそれらの遺伝子構造解析から 5 種類の TEM 型に分類した（井上）。③全国の臨床分離肺炎球菌、インフルエンザ菌の PBP 変異によるβ-ラクタム耐性を遺伝子レベルで解析し、それらの検出方法のための基礎的研究を行った（生方）。④緑膿菌の多剤耐性に関与する薬剤排出ポンプの新たな排出ポンプによる薬剤排出機構の解析を行い、薬剤排出ポンプ蛋白の遺伝子の発現機構を明らかにした（後藤、中江）。⑤大腸菌、緑膿菌のマクロライド耐性機構が不活化酵素によることを明らかにした（山本）。⑥MRSA のコロニーからの各種アミノ配糖体耐性検出のための multiplex PCR 方法を開発した。（堀田）⑦黄色ブドウ球菌のテイコプラニン耐性機構の遺伝学的基礎研究を行い、テイコプラニン耐性に関連する遺伝子群をクローニングし解析した（和田）。⑧日本で分離される VanA 型 VRE の遺伝子構造解析と耐性発現調節機構を明らかにし、日本特有の VanA 型 VRE の存在を明らかにした（池）。⑨無芽胞性嫌気性菌 *Fusobacterium* の薬剤耐性の基礎的研究立ち上げのため、その感染症の疫学的研究を行った（渡邊）。⑩臨床検査で用いられている各種 ESBL 検出用キットの精度調査を行なった（山口）。

分担研究者			井上松久	北里大学医学部	教授
荒川宜親	国立感染症研究所	部長	生方公子	明治製菓(株)薬品総合研究所	
中江太治	東海大学医学部	教授			客員研究部長
後藤直正	京都薬科大学薬学部	助教授	堀田国元	国立感染症研究所	室長
和田昭仁	国立感染症研究所	室長	渡邊邦友	岐阜大学医学部	教授
山本友子	千葉大学薬学部	教授	山口恵三	東邦大学医学部	教授

A. 研究目的

最初の抗生物質ペニシリンが発見開発され 1940 年代に実用化されて以降、次々と新しい抗生物質が開発され医療で用いられてきた。一方抗生物質の使用量に伴い各種の薬剤耐性菌も次々と出現し、多剤薬剤耐性菌が重症院内感染原因菌として問題となっている。それらの薬剤耐性菌の中で黄色ブドウ球菌の MRSA、多剤耐性緑膿菌、 β -ラクタム剤耐性グラム陰性桿菌、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 等は現在の医療現場の院内感染原因菌として、その感染症治療の困難さ、感染症治療及び防御対策に対する医療経済的負担の増大により深刻な問題となっている。そして現在では薬剤耐性菌の防御対策は、国家的、世界的規模で取り組まなければならない時代となっている。薬剤耐性菌の増加と、拡散防止対策及びそれらによる院内感染防御対策には、①薬剤耐性菌の分離状況及び薬剤耐性菌感染症の調査、②薬剤耐性機構の基礎的研究と検出方法の開発、③薬剤耐性菌に対する新薬の開発及び防御に対する教育、の 3つの行動が必要である。①の調査研究は厚生科学研究において、荒川班において行なわれており、本研究班は薬剤耐性機構の基礎的研究と検出方法の開発を目的としている。そして次々と出現する新しい薬剤耐性菌を解析し、その検出方法及びレファレンス化を目指して研究を行う。又、本研究班は荒川班の調査研究と連動し、お互い補強しあう形で遂行することを目的としている。

B. 研究方法

1. 薬剤耐性検査、NCCLS 法に基づく寒天平板希釈方法及び微量液体方法を用いた (共通)
2. PCR 法を用いた各種薬剤耐性遺伝子の解析と、新たな薬剤体制遺伝子の検出 (共通)
3. 遺伝子塩基配列の決定 (共通)
4. 薬剤耐性遺伝子のクローニングと遺伝子構造解析 (共通)
5. 遺伝学的変異株の分離と遺伝子発現機構の解析 (共通)
6. 免疫化学的方法を用いて、耐性発現蛋白の機能を解析 (後藤)

C. 研究結果

荒川宜親

- ・カルバペネム耐性緑膿菌から新たな耐性機構の耐性菌を分離し、その検出方法の開発のために、耐性遺伝子の解析を行った。
- ・新たに分離された耐性緑膿菌はカルバペネム耐性緑膿菌で、セフェム剤セフトジジム (CAZ) とカルバペネム剤イミペネム (IPM) に高度耐性を示した。代表的なカルバペネム剤耐性遺伝子である IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼ生産遺伝子検出用 PCR プライマーを用いては、同じ遺伝子を検出できなかった。ヨーロッパで報告されている新たなメタロ- β -ラクタマーゼ生産遺伝子検出用プライマーを用いて調べた結果、これまで日本で分離されていない新たなメタロ- β -ラ

クタマーゼ、VIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ生産によるカルバペネム耐性緑膿菌であることが解った。この耐性菌は日本で既に3県から分離されていることが解った。

池 康嘉

- ・日本の養鶏場糞便から分離された VanA 型 VRE3 株の遺伝学的研究を行った。
- ・3 株の VRE はすべてバンコマイシン高度、テイコプラニン低度耐性であった。グリコペプチドセンサー蛋白 *VanS* 遺伝子に3個所の変異が存在した。これらタイからの輸入鶏肉から分離される VanA 型 VRE と同じ遺伝子構造であった。

中江太治

- ・緑膿菌の多剤耐性を発現する、薬剤排出ポンプ遺伝子の発現調節機構の解析。
- ・緑膿菌の薬剤排出ポンプには4種類存在する。それらの中で多剤耐性を発現する MexEF-OprN 排出ポンプは突然変異によりキノロン耐性となる NfrC 耐性遺伝子と、それとは別の MexT 遺伝子の両者により陽性制御されている。今回緑膿菌の同種 (isogenic) の標準株に、MexT の遺伝子構造 (塩基配列) に3種の variant が存在し、それぞれの variant において NfrC 耐性の変異頻度が異なること、その結果 MexEF-OprN の発現頻度も異なることを見出した。

後藤直正

- ・緑膿菌の新規薬剤耐性排出システム MexX-MexY の機能解析を遺伝学的、免

疫化学的手法を用いて研究した。

- ・ MexX-MexY の機能発現には外膜蛋白 OprM が必要であることが解った。 MexX-MexY は野性株では発現せず、エリスロマイシン、テトラサイクリン、ゲンタマイシン等の存在により発現が一過性に誘導され、キノロン、β-ラクタム薬、テトラサイクリン。エリスロマイシン、アミノ糖等の薬剤の排出を行うことが解った。

和田昭仁

- ・黄色ブドウ球菌のグリコペプチド耐性 (テイコプラニン耐性) 菌の検出方法と耐性遺伝子検出方法を開発するための研究。
- ・黄色ブドウ球菌の実験株 (テイコプラニン MIC~3mg/l) を用いて、テイコプラニン耐性 (MIC8~12mg/L) の変異株を分離し、変異に関連する遺伝子 *tcaRAB* オペロンを同定した。この遺伝子の中でテイコプラニン耐性に必須の遺伝子を解析中である。

山本友子

- ・グラム陰性菌のマクロライド高度耐性菌の検出方法を研究するために、大腸菌、緑膿菌のマクロライド耐性機構について研究を行った。
- ・1997年臨床分離大腸菌500株、緑膿菌300株を調べた結果、それぞれ13株 (2.6%) 及び3株 (0.9%) のマクロライド高度耐性菌が分離され、これらの耐性機構を解析した結果、大腸菌に2種類のリン酸化酵素による耐性、エステラー

ゼ及びメチラーゼによる耐性が存在し、緑膿菌については1種類のリン酸化酵素によるものがあつた。

井上松久

- ・大腸菌、肺炎桿菌の基質拡張型 β -lactamase (ESBL) 生産による、耐性機構の解析研究を行った。
- ・大腸菌、肺炎桿菌の中でセフム剤 CPDX 耐性を示す 85 株について、ESBL 検出用プライマーを用いてその耐性遺伝子を調べた。ESBL の中で TEM 型 ESBL は5種類の異なるものは存在することが解つた。これらの検出方法を開発するため、ESBL の遺伝子構造を解析した。

生方公子

- ・肺炎球菌とインフルエンザ菌の不活化酵素によらない β -ラクタム耐性菌の検出方法を開発する目的で、その耐性遺伝子研究と、疫学的研究を行った。
- ・全国の臨床分離肺炎球菌、インフルエンザ菌の β -ラクタム耐性菌を調査し、 β -ラクタム薬の標的である細菌の細胞壁合成酵素 PBP (Penicillin binding proteins ; ペニシリン結合蛋白) の変異による耐性菌が肺炎球菌で約 45%、インフルエンザ菌で約 10% 分離されることが解つた。これらの PBP の遺伝子変異を解析し検査方法を研究した。

堀田国元

- ・MRSA の各種アミノグリコシド耐性を迅速簡便検出するためのコロニーPCR法を確立するための研究を行った。

- ・MRSA 検出のための *mecA* 特異的プライマー、3 種類のアミノグリコシド耐性遺伝子 (*aac(6')* / *aph(2'')*, *aph(3')*, *aad(4',4'')*) 検出のためのプライマー、黄色ブドウ球菌検出のためのコアグラーゼ遺伝子特異的プライマーの全てを含む multiple プライマーを用い、コロニーから検出することを行なつた。臨床分離 MRSA を用いて検出を行なつた結果、この multiplex コロニーPCR による検出方法が有効であつた。

渡邊邦友

- ・無芽胞嫌気性グラム陰性桿菌の *Fusobacterium* の抗菌薬耐性化と耐性機構の解析を行い、その検出方法の研究を行う。
- ・臨床分離 *Fusobacterium* が分離された 108 症例についてその臨床的背景及び感染部位、混合感染の有無について詳しく調べ、その細菌学的な症態像を調べた。また 108 株の菌について、各種抗菌剤の MIC を調べた。この菌については、微量液体希釈方法で薬剤の MIC を測定できない株が存在することが解り、MIC 測定方法も含めて今後研究を続行して行く。

山口恵三

- ・臨床検査で用いられている各種の拡張型 β -lactamase (ESBL) 検出のシステム (検出用キット) の精度の比較研究を行ない、その有用性について調べた。
- ・用いたキットは Vitek II パネル、MicroScan ESBL 分離用パネル、Etest

及びKB法ディスクの4社のESBL検出用キット。用いた培地はすでにESBLと同定されている各種のESBL産生菌。この結果、それぞれのキットにおいて検出精度は70%~95%のばらつきがあるが、ほぼ日常検査に用いることの出来る精度であった。

D. 考察

本年度は、大きく次のような研究が行われた。新たに臨床分離された薬剤耐性菌についての耐性遺伝子の構造解析及び耐性発現機構の基礎的研究 [緑膿菌のメタロ- β -ラクタマーゼ (荒川)、VanA 型 VRE (池)]、新たに問題となっている耐性についての遺伝学的、生化学的な実験的解析に基づく耐性機構の研究 [緑膿菌の排出ポンプの研究 (中江、後藤)、MRSA のテイコプラニン耐性 (和田)、緑膿菌のマクロライド耐性 (山本)]、薬剤耐性菌の臨床分離株の中で、臨床上問題となる薬剤耐性菌の疫学調査と耐性機構、又は耐性遺伝子の構造解析に基づく耐性菌分離方法の研究 [大腸菌、肺炎桿菌の拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) (井上)、肺炎球菌、インフルエンザ菌の細胞壁合成酵素(PBP)s変異による β -ラクタム耐性 (生方)]、概知薬剤耐性について、問題となっている細菌、耐性を、PCR 法を用いてコロニーから検出する方法 [MRSA のアミノグリコシド耐性 (堀田)]、一般に研究があまり行われていなく、臨床上重要な菌種についての研究立ち上げの為の感染疫学的基礎研究 [無芽胞性嫌

気性菌 *Fusobacterium* 感染症と薬剤耐性 (渡邊)]、検査で使用されている薬剤耐性菌検出キットの精度、有用性の検査 [各種 ESBL 検出システムの比較検討 (山口)] 等の研究が行われた。緑膿菌のメタロ- β -ラクタマーゼはその感染症治療が非常に困難となる耐性菌である。荒川らが分離解析した緑膿菌のメタロ- β -ラクタマーゼ (VIM-2)生産菌は、新たな耐性菌であり、日本の臨床現場での拡散が危惧される。その拡散防止のための、耐性機構の解析及び検出方法の研究により、検出の為の有用な成果が得られた。VRE の拡散と院内感染症の増加はその感染治療及び医療経済上、医療界に深刻な問題となる。日本は先進国では唯一 VRE が拡散していない国であり、その拡散防止のために、我が国で散発的に分離される VRE の耐性遺伝子構造解析が、その検出方法の開発のために必須である。今回解析された VanA 型 VRE は日本特有の VanA 型 VRE で、日本とタイ国以外の他の国では分離されていない菌である。グラム陰性菌の ESBL は β -ラクタム剤耐性を発現し、臨床上問題となる耐性である。臨床分離菌の ESBL の遺伝子構造解析を行い、その検出方法の開発のための基礎的研究が行われた。緑膿菌の薬剤排出ポンプは、キノロン耐性を含め各種の薬剤に多剤耐性となる。緑膿菌においては、不活化酵素による耐性と共に、排出ポンプは臨床上重要な耐性機構であり、その耐性機構の詳細な研究が行われた。不活化酵素によらな

い細胞壁合成酵素 (PBP) の変異による肺炎球菌、インフルエンザ菌は今後増加する傾向にある。これらの菌は成人髄膜炎の重要な起因菌であるため、今後とも疫学的調査及び研究を進める。MRSA のアミノ糖耐性は β -ラクタム耐性と共に、MRSA に多剤耐性を賦与する耐性である。今回研究開発された検出方法は、PCR を用いて検査することの可能な臨床検査室の現場では有用と考えられる。臨床分離 MRSA はバンコマイシン感受性であるが、同じグリコペプチド系のテイコプラニンには耐性菌 (MIC \sim 8 μ g/ml) が少数ながら存在する。今後これらのテイコプラニン耐性菌が、他のグリコペプチド系薬剤に与える影響も含めた基礎的研究として発展させていく。嫌気性菌の *Fusobacterium* 感染症とその耐性については今まで、ほとんど研究が行われておらず、その臨床的疫学的基礎研究が行われた。グラム陰性菌のマクロライド耐性は、臨床分離頻度は少ないが、グラム陰性菌のマクロライド耐性として興味のある耐性である。

E. 結論

この研究班で研究されている細菌と薬剤耐性は日本及び各国において、院内感染原因菌として現在問題となっている細菌がほぼ全て含まれている。今回の研究成果は、既に検出に用いることが可能な研究と、検出方法開発のための遺伝学的生化学基礎研究において研究結果が出た。今後さらに研究を広げ進展させる。

F. 研究成果等

1. Hashimoto, Y., et al., Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant enterococcus strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *EEMS Microbiology Letters*. 2000. 185: 247-254.
2. Ozawa, Y., et al., Identification of Enterococci at the Species Level by Sequencing of the Genes for D-alanine: D-alanine Ligases. *System. Appl. Microbiol.* 2000. 23: 230-237.
3. Ike, Y., et al., Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *Lancet*, 1999. 353, 9167: 1854.

その他の研究成果は各班員の報告の中に記載

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

名称：アンピシリン耐性インフルエンザ菌の検査法およびそのキット

出願番号：特願平11-155399

特許公開：2000年12月

Ⅱ. 分担研究報告書（平成 12 年度）

カルバペネム耐性緑膿菌から分離されたVIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ

分担研究者 荒川 宜親（国立感染症 細菌・血液製剤部）

研究要旨

国内で臨床分離されたセフトジジム(CAZ)とイミペネム(IPM)に耐性(MIC, >64 μg/ml)を獲得した緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)について、CAZ, IPM耐性に関与する機構について解析を行った。この株は、CAZやIPMに耐性を示し、Arakawaらが最近開発・実用化したメルカプト化合物を用いたスクリーニング試験により、メタロ-β-ラクタマーゼの産生が強く疑われた。しかし、国内で多く分離されるIMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼを検出するPCRプライマーを用いたPCR解析にて「陰性」と判定されたため、新規のメタロ-β-ラクタマーゼを産生している株であることが強く疑われた。そこで、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複数のメタロ-β-ラクタマーゼを検出するPCRプライマーを作成し解析を行った結果、最近、フランスやギリシャで報告されている新しいVIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼを産生する株であることが明らかとなった。

このVIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼは、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼと比較した場合、32.7%のアミノ酸配列上の相同性を示すが、これまでに国内では確認されておらず、この種のメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の増加にも今後警戒する必要がある。

研究協力者： 柴田尚宏、土井洋平、柴山恵吾、
黒川博史
(感染症：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幅広い抗菌活性を示す、イミペネム(IPM)などのカルバペネム系薬が緑膿菌や肺炎桿菌などによる感染症の治療薬として広く用いられてきた。カルバペネム系抗菌薬としては、現在、パニペネム(PPM)やメロペネム(MPM)なども認可され、現時点でも大腸菌などの腸内細菌科の各菌種から、緑膿菌などのブドウ糖非発酵菌に至るまで、広い抗菌活性が期待できるため臨床現場で賞用されている。しかし、緑膿菌などの一部の菌種では、耐性菌の出現が報告されている。国内で臨床分離される緑膿菌におけるイミペネム耐性菌の分離頻度は約20%に達しておりその多くは、外膜蛋白であるD2ポリリン蛋白の欠損株と考えられるが、イミペネムのMIC値が64 μg/mlを越える高度耐性株も1~2%程度存在し、それらは、IMP-1型のメタロ-β-ラクタマーゼを産生する株であることが多く、内外で警戒されている。

国内で検出されるメタロ-β-ラクタマーゼの多くはIMP-1型であり、欧米で広がりつつある、VIM-型β-ラクタマーゼはこれまで国内では確認されていなかった。しかし、今回、平成12年度から厚生労働省により開始された「院内感染対策サーベイランス事業」の中で、近畿地区の医療機関からIPMやCAZ

に高度耐性を示し、しかもメルカプト法による検査でメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌であることが強く疑われたものの、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を検出するPCRプライマーを用いたPCR解析では「陰性」と判定された緑膿菌が検出されたため、その確認と耐性機構を解明するため研究を行った。

B. 研究方法

1. IPM, CAZ耐性菌の感受性試験の再検査

2000年8月に、近畿地区の一医療施設の患者からIPMとCAZに高度耐性を示す緑膿菌が分離されたため、その薬剤感受性をNCCLS法により再検査した。

2. メルカプト化合物による検査

メタロ-β-ラクタマーゼを強く阻害する2-メルカプトプロピオン酸または、メルカプト酢酸ナトリウムを用いて、本菌がメタロ-β-ラクタマーゼを産生しているか否かを解析した(1)。

3. PCR解析

耐性株をLB培地を用いて、1,000,000 CFU/ml程度の菌数まで培養した後、DNAを煮沸法により抽出し定法により、様々なβ-ラクタマーゼ遺伝子を検出できるPCRプライマーセットを用いたPCR解析により遺伝子の検出を行った。

4. 遺伝子の塩基配列の決定

増幅されたPCR産物を鋳型として、ダイターミネーター法により塩基配列の決定を行った。

5. 国内の分離株でのVIM-2産生株のスクリーニング
過去に国内で分離された、IPM, CAZ耐性株につい

てメルカプト化合物による阻害試験を行い、メタロ-β-ラクタマーゼの産生が強く疑われた株についてIMP-1検出用のPCRプライマーを用いたPCR解析を行った。

C. 研究結果

1. 感受性試験結果

親株である緑膿菌に対するIPMとCAZのMIC値は各々、64 μg/ml以上であった。

2. メルカプト化合物による検査

メタロ-β-ラクタマーゼを強く阻害する2-メルカプトプロピオン酸あるいは、メルカプト酢酸ナトリウムを用いて、阻害検査を行った結果、本菌はメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌であることが強く示唆された。

3. PCR解析

メルカプト法によりメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌であることが強く疑われたが、IMP-1の遺伝子を検出するPCR解析では「陰性」と判定されたため、海外で報告されているVIM-1, VIM-2などのメタロ-β-ラクタマーゼの遺伝子を検出するPCRプライマーを用いて解析を行ったところ、VIM-2検出用のプライマーで「陽性」と判定された。

4. 遺伝子の塩基配列の決定

PCR産物を鋳型として、ダイターミネーター法により塩基配列の決定を行った結果、フランスで報告されたVIM-2遺伝子と全く同じ配列であることが確認された。

5. 国内分離株におけるVIM-2産生株の確認

過去の分離株を解析した結果、1997年に秋田県で分離された緑膿菌1株がVIM-2産生株であることが判明した。また、2000年に静岡県で分離された3株がVIM-2産生株であることが判明した。したがって、国内には少なくとも3カ所の医療機関でVIM-2を産生する緑膿菌が生息していることが判明した。

D. 考察

今回、国内で分離されたIPM, CAZ耐性の臨床分離緑膿菌から、国内ではじめてVIM-2型のメタロ-β-ラクタマーゼが確認された。これまで、国内で分離されるIPM, CAZ耐性緑膿菌やセラチアなどは、その殆どがIMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌であった。しかし、今回の解析調査により、フランスやギリシャなど欧州で分離されているVIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌と同様の耐性菌が、既に国内に侵入し、東北、東海、近畿の複数の施設に生息し

ていることが明らかとなった。この事実は、カルバペネムやセファマイシンなどを多用している我が国では、IMP-1のみならず、今後、VIM-型β-ラクタマーゼ産生菌の増加にも注意しなければならない事を示しており、今後の動向を注意深く監視する必要がある。

VIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼの遺伝子は、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼと同様に伝達性の巨大プラスミド上に存在している場合が多い。IMP-1は、*Bacteroides fragilis*から発見されたメタロ-β-ラクタマーゼに遺伝的に近いが、VIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼは、*Bacillus cereus* IIから発見されているメタロ-β-ラクタマーゼに近い特徴をしめすものの、その由来は不明である。既に、IMP-1の変種としてIMP-2, IMP-3, IMP-4などのバリエーションが海外で多数出現しており、我が国のように、カルバペネムを賞用する傾向がある医療環境では、今後、新規のメタロ-β-ラクタマーゼを産生するカルバペネム耐性菌が出現する危険性が高く、それらの出現と蔓延を防止するためにも、広域β-ラクタム薬の使用について一層の注意が必要となっている。

メタロ-β-ラクタマーゼの産生菌を検出する方法として、これまでは、薬剤感受性試験しかなく、類似の耐性パターンを示すAmpC型セファロsporin産生菌や、ESBL産生菌と識別することがしばしば困難となっていた。確認試験もPCR解析しかなく、費用や技術の面などから、一般の細菌検査室での日常業務の中での実施は困難であった。しかし、メルカプト化合物を用いての検査法の導入により、簡便にメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を検出することが可能となり、今後、IMP-1やVIM-2以外にも様々なメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出が進むものと期待される。

E. 結論

国内で分離された、IPM, CAZ耐性の緑膿菌から、国内ではじめてVIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株を確認した。しかもそれらは、東北、東海、近畿地区の3カ所の医療施設から分離されたため、既に、国内に広くVIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌が分布している可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

今回、国内ではじめて、VIM-2型のメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌が確認された。イミペネムなどのカルバペネム薬はグラム陰性桿菌による感染症に対する「特効薬」「最後の切り札」的抗菌薬の一つであるため、この種の抗生物質に耐性を獲得した緑膿菌などの出現は、化学療法の実施に大きな障害とな

る。緑膿菌感染症の治療に用いられるアミカシンなどのアミノグリコシド系抗生物質やレボフロキサシン、シプロフロキサシンなどのフルオロキノロン薬に耐性を獲得した株も各地で分離されているため、今後、さらにカルバペネム耐性を獲得したメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の動向については、MRSAやVREと同様に特別な警戒や対策が必要と思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

- a. 柴田尚宏、他、国内で初めて確認されたVIM-2様メタロ-β-ラクタマーゼ、日本化学療法学会 東日本支部総会、旭川、2000年10月
- b. 柴田尚宏、他、カルバペネム耐性緑膿菌より検出されたVIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の解析、緑膿菌感染症研究会、横浜、2001年1月
- c. 柴田尚宏、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出意義、日本臨床微生物学会学術集会、岐阜、2001年2月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

表1 メタロ-β-ラクタマーゼを産生する菌
グラム陽性菌

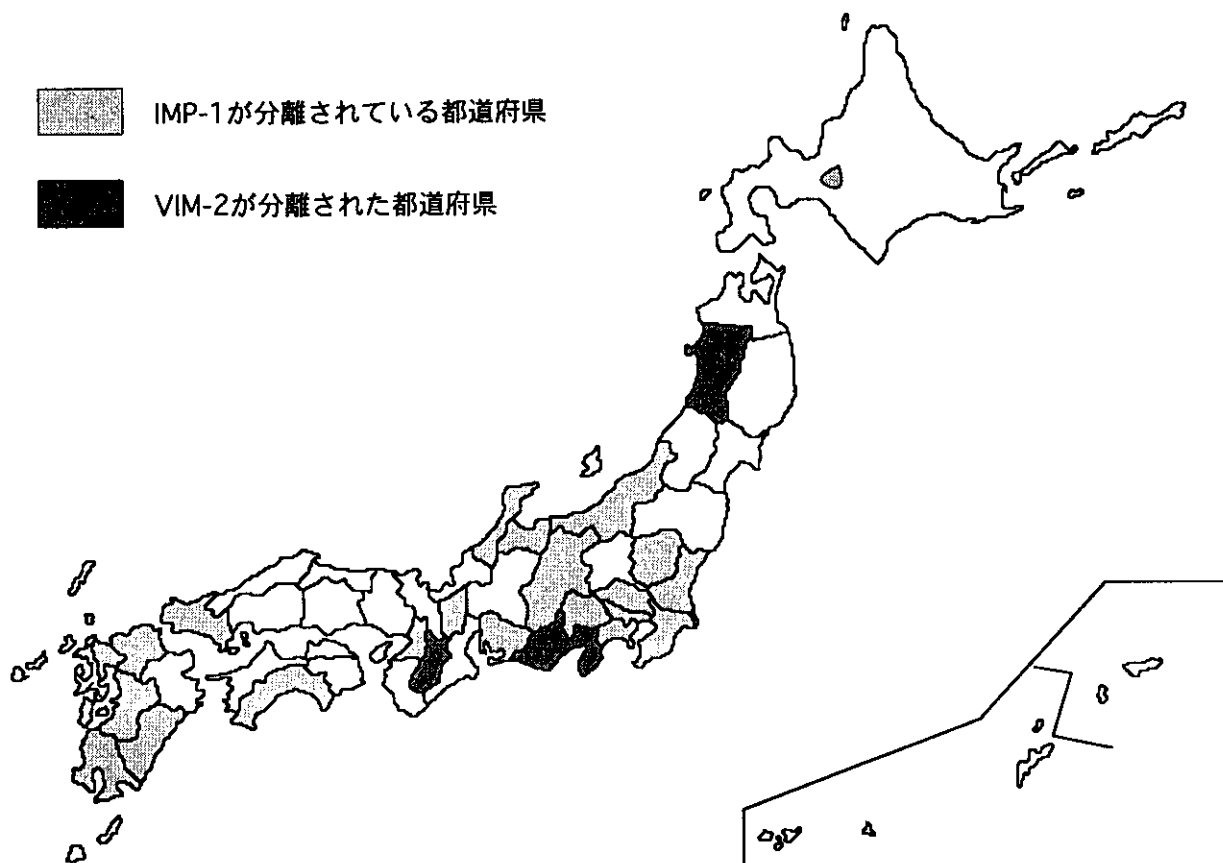
- Bacillus cereus* (一部の菌株)
- Bacteroides fragilis* (一部の菌株)

グラム陰性菌

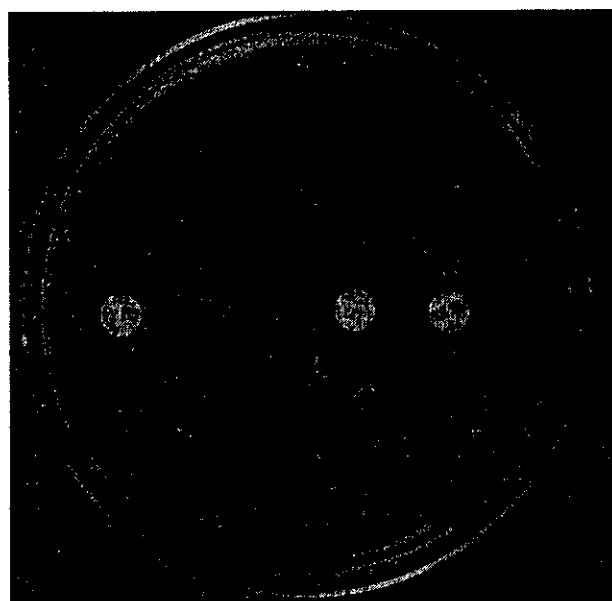
(染色体性)

- Stenotrophomonas maltophilia* (全ての菌株)
- (プラスミド性)
- Pseudomonas aeruginosa* (一部の菌株)
- Acinetobacter baumannii* (一部の菌株)
- Pseudomonas putida* (一部の菌株)
- Pseudomonas fluorescens* (一部の菌株)
- Alcaligenes* spp. (一部の菌株)
- Chryseobacterium indologenes* (一部の菌株)

- Serratia marcescens* (一部の菌株)
- Klebsiella pneumoniae* (一部の菌株)
- Enterobacter* spp. (一部の菌株)
- Citrobacter* spp. (一部の菌株)
- Providencia rettleri* (一部の菌株)



メルカプト酢酸による阻害試験



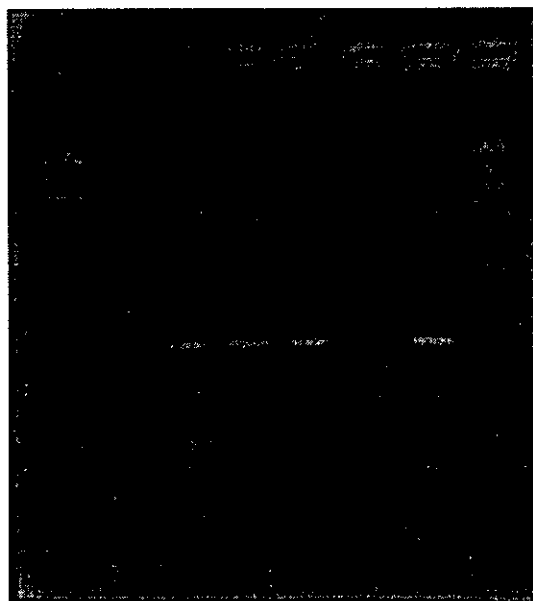
CAZ
(セフトジジム)

メルカプト酢酸
ナトリウム(SMA)

SMAによりVIM-2が阻害され見かけ上CAZに感受性となりCAZdiskの周辺に発育阻止帯が出現する。

PCR解析結果

M N P A B C D M



M : マーカー
N : 陰性対照株
P : 陽性対照株
A : 被検株A(VIM-2 陽性株)
B : 被検株B(VIM-2 陽性株)
C : 被検株C(VIM-2 陰性株)
D : 被検株D(VIM-2 陽性株)

IMP-1とVIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼのアミノ酸配列の比較

```

IMP-1    1'          MSKLSVFFFIFLFCSLATAAESLPDLKIEKLDGTVVHTSF E
                               .. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
VIM-2    1" MFKLLSKLLVYL TASIMAIASPLAFSVDSSGEYPTVSEIPVGEVRLYQIADGVWSHIATQ

IMP-1    42' EVNGWGVVPKHGLVVLVNAEAYLIDTPFTAKDTEKLVWIFVER-GYKIKGSISSHFHSDS
        . . * . * . * . . . . . * . . * . . . . . . . . . * . . . . . * . . . * . . . . . * . .
VIM-2    61" SFDG-AVYPSNGLIVRDGDELLLDITAWGAKNTAALLAEIEKQIGLFPVTRAVSTHFHDDR

IMP-1    101' TGGIEWLNSRSIPTYASELINELLKKGDKVQATNSFSGVNYW--LVK-NKIEVFYPGPGH
        . . . . * . . . . . . . . . . * . * . . . . . . . . * . . . . * . . . . . . . .
VIM-2    120" VGGVDVLRAGVATYASPSTRRLAEVEGNEIPTHSLLEGLSSSGDAVRFVGPVELFYPGAHAH

IMP-1    158' TPDNVVWVLPKILFGGC--F-IKPYGLGNLGDANIEAWPKSAKLLKSKYKAKLVVPS
        . . . . * . . . . . . . . . . * . . . . . . . . . . . . . . * . . . . . * . . . . .
VIM-2    180" STDNLVWVPSASVLYGGCAIYELSRSTSAGNVADADLAEWPTSIERIQQHYPEAQFVIQPG

IMP-1    215' HSEVG DASLLKLTLEQAVKGLNESKKPSKPSN
        * . * . . . . . * *

VIM-2    240" HGLPGGLDLLKHTTINVVKAHTNRSVVE
    
```

[32.7% / 214 aa]

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）の耐性機構の研究とレファレンス及びVREの拡散原因

主任研究者 池 康嘉（群馬大学医学部微生物学教室）

研究協力者 谷本弘一、藤本修平、富田治芳、小澤良之

研究要旨 我が国の全国調査では鶏舎糞便から3株（GV1、GV2、GV3）、ニワトリの腸管から1株（GV4）のVREが分離されている。この研究ではこれらの日本のニワトリから分離された4株のVREについて遺伝学的に解析した。GV1、GV2、GV3、およびGV4はPCR法およびサザンハイブリダイゼーション法により *vanA* 遺伝子の存在が確認された。GV4では、バンコマイシンのMICは256 µg/ml、テイコプラニンのMICは32 µg/mlとバンコマイシン、テイコプラニンともに高度耐性を示した。GV1、GV2、GV3ではバンコマイシンのMICは256 µg/ml、512 µg/ml、512 µg/mlと高度耐性を示したが、テイコプラニンのMICは1あるいは2 µg/mlであり、これらの株は両薬剤に対して高度耐性を示す典型的なVanA型の耐性型とは異なっていた。GV2では接合伝達によりバンコマイシン耐性は伝達された。GV2より単離されたプラスミドpMG2の大きさは約85 kbpであった。遺伝子解析の結果、pMG2はVanA型標準株の*vanA* 遺伝子群（*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*）（*vanRS*, 耐性発現のための調節遺伝子、*vanHAX*, 耐性発現のための構造遺伝子、*vanYZ*, 付帯遺伝子）をすべてもっていた。DNA塩基配列の解析から、調節遺伝子である*vanS*以外の遺伝子はすべてVanA型標準株のそれと同じであった。*vanS* 遺伝子では3箇所の塩基が標準株の*vanS* 遺伝子と異なっていた。これは*vanS* 遺伝子に変異が起きたものと考えられた。塩基配列より推測されるVanS蛋白のアミノ酸配列には塩基の変異に対応する3つのアミノ酸部位に変異が存在した。GV2の*vanS*のアミノ酸の変異はGV1、GV3にも存在していたが、GV4では存在しなかった。これらの株はテイコプラニン低度耐性であるが、テイコプラニン耐性がバンコマイシンによって誘導された。

A. 研究目的

グリコペプチド系抗生物質にはバンコマイシン(Van)、テイコプラニン(Teic)、アボパルシン(Avop)が存在する。バンコマイシン、テイコプラニンは主として、ペニシリン、セファロsporin等の β -ラクタム剤耐性グラム陽性菌感染症治療に用いられ、我が国ではMRSA感染症に用いられる。アボパルシンは家畜特に鶏の成長促進の目的で用いられてきた。高度バンコマイシン耐性腸球菌 Vancomycin resistant enterococci(VRE)は1988年にヨーロッパで報告されて以来、欧米において重要な院内感染症の原因菌とされている。VREは日和見感染菌であるが、現存するすべての抗生剤に耐性であることが多く、その感染症に有効な抗菌剤が存在しないことが起こるため、問題となっている。我が国においては1996年にはじめてVREが人から分離されて以来、4箇所の病院で8例のVanA型の感染例が報告されている。臨床分離VREの中で主な獲得耐性のVREはVanA型、VanB型の2種類報告されている。VanA型はバンコマイシンにもテイコプラニンにも高度耐性であり、その耐性遺伝子はバンコマイシンによってもテイコプラニンによっても誘導される。VanB型はバンコマイシン耐性は中等度から高度であり、テイコプラニンには感受性である。その耐性遺伝子はバンコマイシンによってのみ誘導される。アボパルシンはヨーロッパとアジアの一部の国において鶏の成長促進の目的で飼料に添加され、長期に用いられた。そのためヨーロ

ッパでは鶏腸管糞便中のVREを選択的に増やし、それが人細菌叢に侵入したと考えられている。日本でもアボパルシンは1989年から1996年にかけて使用された。我が国の全国調査では鶏舎糞便から3株(GV1, GV2, GV3と命名)、鶏の腸管から1株(GV4と命名)のVanA型のVREが分離されている。この研究ではこれらの日本の鶏から分離された4株のVanA型のVREについて遺伝学的に解析した。

B. 研究方法

用いたVREは鶏舎糞便由来GV1, GV2, GV3、鶏腸管由来GV4である。VanA型標準株は*E. faecium* BM4147 (Van 512 μ g/ml, Teic 128 μ g/ml)、Van感受性株は*E. faecalis* FA2-2 (Van 2 μ g/ml, Teic \leq 0.5 μ g/ml)である。薬剤の最小発育阻止濃度(MIC)の測定は寒天平板希釈法によって行った。*vanA*遺伝子の検出はPCR法およびサザンハイブリダイゼーションによった。*vanA*遺伝子の構造解析のためのDNA塩基配列の解析は、*vanA*遺伝子を含む4.1kbのフラグメントについてはクローン化し、nested deletion mutantsを作製し塩基配列を決定した。他の遺伝子群はPCRにより増幅しその塩基配列を決定した。

C. 研究結果と考察

GV1、GV2、GV3、およびGV4は*vanA*遺伝子の存在が確認された。GV4はバンコマイシンのMICは256 μ g/ml、テイコプラニンのMICは32 μ g/mlとバンコマイシン、テイコプラニンともに高度耐性を示した。GV1、

GV2、GV3はバンコマイシンのMICは256 μ g/ml、512 μ g/ml、512 μ g/mlと高度耐性を示したが、テイコプラニンのMICは1あるいは2 μ g/mlであり、これらの株は両薬剤に対して高度耐性を示す典型的なVanA型の耐性型とは異なっていた。GV2、GV3では接合伝達によりバンコマイシン耐性は伝達された。GV2より単離されたプラスミドの大きさは約85kbpであった。遺伝子解析の結果GV2はVanA型標準株のVanA型の遺伝子群(*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*; *vanRS*, 耐性発現のための調節遺伝子、*vanHAX*, 耐性発現のための構造遺伝子、*vanYZ*, 付帯遺伝子)すべてをもっていた。DNA塩基配列は調節遺伝子である*vanS*以外の遺伝子はすべてVanA型標準株のそれと同じ遺伝子構造をしていた。*vanS*遺伝子は3箇所の塩基が標準株の*vanS*遺伝子と異なっていることから*vanS*遺伝子に変異が起きていることが判った。塩基配列より推測されるVanS蛋白のアミノ酸も塩基配列の変異に対応する3つのアミノ酸部位に変異が存在した。GV2の*vanS*のアミノ酸配列の変異はGV1、GV3でも存在していたが、GV4では存在しなかった。これらの株はテイコプラニン低度耐性であるが、これらの株のテイコプラニン耐性がバンコマイシンによって誘導されるかどうか調べた。GV1、GV2、GV3をバンコマイシンとテイコプラニンの両薬剤を含む寒天平板に培養した時、これらの株が生育できるテイコプラニンの濃度はバンコマイシンの濃度に比例して高くなり、最高、

バンコマイシン128 μ g/mlとテイコプラニン8~16 μ g/mlを含む培地に生育した。高濃度のバンコマイシンとテイコプラニンに生育したこれらの株のコロニーを再度薬剤の入っていない平板で3回経代培養した後、再度耐性値を測定すると、テイコプラニンのMICは1~2 μ g/mlと元株のテイコプラニン耐性値と同じ耐性値を示した。すなわち、GV1、GV2、GV3においてグリコペプチド(バンコマイシン、テイコプラニン)耐性はバンコマイシンによって誘導されるがテイコプラニンによっては誘導されないということがわかった。一方、GV4においてはテイコプラニンのMICは、バンコマイシンの存在にかかわらず、一定であった。このことから、GV1、GV2、GV3における*vanS*部のアミノ酸配列の変異が、これらの株のテイコプラニンに反応する機構を阻害し、その耐性値を低レベルにしているものと考えられた。

D. 結論

今回解析したVREは国内の養鶏糞便から分離されたものである。昨年度報告したタイ鶏肉由来VRE及び国内の患者から分離されたVREにも、*VanS*遺伝子に今回と同様の3ヶ所に変異があった。この変異は日本で分離されるVanA型VREに特異的に存在する変異であり、日本のVanA型VRE検出の指標となり得る。

E. 研究発表

1. Hashimoto, Y., et al., Amino acid substitutions in the VanS sensor of

- the VanA-type vancomycin-resistant enterococcus strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. *EEMS Microbiology Letters*. 2000. 185: 247-254.
2. Ozawa, Y., et al., Identification of Enterococci at the Species Level by Sequencing of the Genes for D-alanine: D-alanine Ligases. *System. Appl. Microbiol.* 2000. 23: 230-237.
 3. Ike, Y., et al., Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *Lancet*, 1999. 353, 9167: 1854 .

MexEF-OprN ポンプの発現を制御する *mexT* 遺伝子の野生株緑膿菌における変動に関する解析

研究者：中江太治 東海大学医学部 教授

研究要旨：緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は *nfxC* 変異を起こすことにより MexEF-OprN 薬剤排出ポンプを発現し、複数の抗生物質に耐性を示すようになる。この MexEF-OprN ポンプは陽性制御因子 MexT によってその発現が調節されていることがわかっている。ところが研究室保存標準株から *nfxC*-型変異株を分離しようとするとその分離頻度は菌株間で数桁の違いがあることが明らかとなった。そこで研究室保存のいわゆる標準緑膿菌株を数株集めそれらの *mexT* 遺伝子を詳細に調べた。その結果研究室保存標準株の *mexT* は大きく 3 つの型に分けることができた。I 型：野生株の *mexT* には変異が見出され、*mexT* は不活性の MexT 蛋白質をコードした。この株から *nfxC* 型変異株を分離すると変異のあった *mexT* 部分に 2 次的な変異が入っており活性のある MexT を産生するようになっていた。II 型：野生株の *mexT* には 8bp の挿入変異が存在したが、この株から得られた *nfxC* 型変異菌では先の 8bp の挿入が欠落し、活性のある MexT をコードした。III 型：野生株の *mexT* もこれから得られた *nfxC* 型変異株の *mexT* も共に一致した *mexT* の配列を有していた。従って III 型から得られる *nfxC* 変異株では未同定のポンプ制御因子に変異があるものと考えられた。これらの結果は薬剤排出ポンプ発現による多剤耐性菌の理解に重要な情報を提供するものである。

A. 研究目的

Infections of *Pseudomonas aeruginosa* to patients with low immune activity are a major problems in hospitals because the bacterium shows natural and acquired resistance to a broad spectrum of antibiotics. Natural antibiotic resistance of this organism is mainly attributable to the interplay of tight outer membrane permeability and low-level expression of the MexABM efflux pump. A few classes of mutants such as *nalB*, *nfxB* and *nfxC* exhibited higher levels of resistance to many drugs than the wild-type strain. Among them, *nfxC*-type mutant overexpresses the MexEF-OprN efflux pump and represses the OprD porin production, and consequently exhibits multidrug resistance. Expression of both the MexEF-OprN pump and the OprD porin was regulated by *mexT*. However, the sequence of *mexT* in the wild-type strain appeared identical with that in the *nfxC*-type mutant in particular there were a few different *P. aeruginosa* PAO1 strains, we designated PAO1 from

combination of strains. Therefore, investigators suggested that *mexEF-oprN* may be regulated by an unidentified effector as well. Thus, expression of the MexEF-OprN pump in the *nfxC*-type mutant is still unexplained. To get insight into this complicated regulation, we investigated the nucleotide sequence of several *mexT*s from the laboratory-stock wild-type strains and their *nfxC*-type derivatives and found that *mexT*s in several wild-type strains were inactive and that there were at least two genetically different *nfxC*-type mutants.

B. 研究方法

2.1. *Bacterial strains and growth conditions.* Bacterial strains used are listed in Table 1.

Since