

20010709

平成13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14年4月

主任研究者 池 康嘉

平成13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
	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	
	野村 隆浩	同上	
	麻 興華	同上	
	林 淑璟	同上	
	浅野 義哉	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	
	岡本 了一	北里大学医学部微生物学	

研究協力者	千葉 菜緒子	明治製菓(株)薬品総合研究所
	小林 玲子	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
	佐藤 剛章	京都薬科大学微生物学教室
	諏訪 雅宣	同上
	村田 健	同上
	西野 武志	同上
	斎藤 孝二郎	東海大学医学部分子生命科学部門
	江田 志摩	同上
	間世田 英明	同上
	土崎 尚史	国立感染症研究所生物活性物質部
	斎藤 文子	同上
	石野 敬子	同上
	石川 敦	同上
	石井良和	東邦大学医学部 微生物学講座
田中香お里	岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設	

分担研究課題及び目次

総括報告書（平成 13 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	----- 5
分担研究報告書（平成 13 年度）		
荒川宜親	カルバペネム耐性緑膿菌から分離された新しいタイプの メタロ- β -ラクタマーゼ IMP-2 に関する研究	----- 15
生方公子	呼吸器感染症ならびに化膿性髄膜炎例から分離される肺炎球菌と 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	--- 20
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 検出法の検討	----- 31
山口忠三	クラス C β -ラクタマーゼを不活化する抗菌薬に関する研究	----- 36
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	----- 40
後藤直正	臨床分離緑膿菌由来多剤排出システムの基質認識バリエーションと 基質認識機構の解析	--- 47
中江太治	MexR を介した MexAB-OprM 排出ポンプの発現調節機構	----- 51
山本友子	ニューキノロン薬耐性菌の耐性遺伝子の解析並びに 耐性メカニズムに関する研究	----- 60
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 —テイコプラニン感受性に影響を与える因子の解析—	----- 69
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 第二報 <i>Fusobacterium</i> の抗菌薬感受性の現況と耐性菌検出法	----- 72
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	----- 76

班会議抄録		81
主な論文別冊		97

I. 総括研究報告書（平成13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 2001年に日本の69医療施設より臨床分離された505株のグラム陰性桿菌メタロ- β -ラクタマーゼを調べた。これまでの一般的なIMP-1型メタロ- β -ラクタマーゼと異なる新型のIMP-2生産菌としてセラチア1株、アシネトバクター4株、緑膿菌1株、セラチア菌はIMP-1型とIMP-2型の両方を生産した。VIM-2型生産菌として、12株が検出された。また、新規に開発したメタロ- β -ラクタマーゼ検出用のメルカプト酢酸ナトリウムを利用したディスク拡散法の有用性を証明した（荒川）。肺炎球菌とインフルエンザ菌の β -ラクタム剤耐性を、新たに開発した β -ラクタム剤耐性検出用のPCR法を用いて、臨床分離菌を調べた結果、この方法がこれらの菌の β -ラクタム剤耐性と耐性機構を検出可能であることが解った（生方）。*Enterobacter cloacae*のAmpC耐性遺伝子保有株の、*in vitro*での高度 β -lactam耐性変異株はAmpC生産量が増加し、AmpC遺伝子の調節遺伝子の変異が存在した。*S. marcescens*由来IMP-6遺伝子にはIMP-1構造遺伝子の640番目の塩基に変異が存在した（井上）。*Enterobacter cloacae*、*E. coli*、*P. aeruginosa*、*C. freundii*それぞれが生産するclassC型 β -ラクタマーゼは、セフェム系薬剤cefcapeoneにより特異的に不活化されることが解った（山口）。MRSAの各種アミノグリコシド系薬剤耐性には、これまで5種類のアミノグリコシド修飾酵素（aad(4',4''), aad(9)、aac(6'')/aph(2''), aph(3''), aaa(6)）が知られている。MRSAの*mecA*遺伝子、コアグラマーゼ遺伝子及び5種類のそれぞれのアミノグリコシド修飾酵素を同時にコロニーから検出できるPCR法（Multiples Colony Direct PCR法）を開発し、臨床分離株を用いてその有用性を証明した（堀田）。*Pseudomonas aeruginosa*（緑膿菌）は、種々の抗菌剤や消毒剤に自然耐性を示す。これには細菌細胞膜蛋白により構成される多剤排出機構が関与する。これまで5種類の機構が解っている。そのうち2種類MexAB-OprM機構、及びMexCD-OprJ機構について、基質を認識する蛋白と考えられているMexB、MexD蛋白の遺伝子構造を臨床分離緑膿菌について解析し、MexD遺伝子に変異が存在すること、及びMexD蛋白の基質を認識する蛋白の領域が解った（後藤）。緑膿菌の抗菌剤に対する自然耐性機構の一つ、MexAB-OprM排出機構の発現調節機構を解析した。MexAB-OprMは調節蛋白

MexR repressor により調節されている。MexA 蛋白の遺伝子の、アミノ末端領域変異株の解析から、この領域に MexR 蛋白が結合するオペレーター一部位が存在することが解った (中江)。2000 年 4 月から 2001 年 3 月の間に臨床分離されたグラム陰性菌 430 株、グラム陽性菌 331 株について、各種ニューキノロン薬耐性を調べた。緑膿菌の耐性菌分離率が最も高く、32% (38 株/118 株) であった。グラム陽性菌では、*S. aureus* 70% (64 株/91 株)、*S. epidermidis* 45% (23 株/51 株)、*E. faecalis* 31% (42 株/51 株) であった。高度キノロン耐性菌についてキノロン剤標的酵素のサブユニット GyrA 遺伝子、ParC 遺伝子の変異をそれぞれ解析した (山本)。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)のテイコプラニン耐性に関連する遺伝子として、*tcaRAB* 遺伝子を同定した。*tcaRAB* 欠損株 (テイコプラニン低感受性 12 µg/ml) と、それぞれの遺伝子との相補実験を行った結果、テイコプラニン感受性には *tcaA*、又は *tcaB* 遺伝子が必要であることが解った (和田)。嫌気性菌 *Fusobacterium nucleatum* 110 株の各種薬剤感受性を、微量液体希釈法、寒天平板法、及び E テストで調べた。3つの方法で同じ結果は得られなかった。寒天希釈法の結果から、ペニシリン・セフェム系薬 6 薬剤に高度耐性 3 株、中等度耐性 3 株、ofloxacin 中等度耐性 2 株が検出された (渡邊)。日本はタイからの主要な鶏肉輸入国である。タイの養鶏環境、タイの輸出用鶏肉の VRE の調査、及び制御対策を行い、これらの調査対象の VRE を顕著に減少させることができた (池)。1997 の全国 278 医療施設の臨床分離 MRSA 6,625 株のバンコマイシンに対する MIC を異なる菌量、異なる培地及び異なる方法を用いて解析した結果、すべての MRSA はバンコマイシンの MIC 2µg/ml であった (池、荒川)。

分担研究者 (五十音順)

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

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 年代に実用化された。しかしながら 1950 年代にはペニシリン分解酵素によるペニシリン耐性黄色ブドウ球菌が出現した。以降、耐性菌に対する合成ペニシリンのメチシリンに始まり、ペニシリン系、及びセフェム系のβ-ラクタム剤を含め、次々と各種の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、新薬に対する各種の薬剤耐性菌も次々と出現してきた。現在では多くの抗生物質に効かない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メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、 β -ラクタム剤耐性グラム陰性桿菌、多剤耐性緑膿菌、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 等、次々と出現した多剤耐性菌は、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。抗生物質は、カルバペネムに代表されるような抗菌域と抗菌力でこれ以上のものは望めない位の抗生物質が出現しているが、これにも効かない耐性菌が出現している。多剤耐性緑膿菌や VRE は現存する抗生物質では治療不可能なことがおこる。これまで耐性菌には新薬に頼っていたが、現在では新薬の開発が手詰まり状態である。たとえ新薬が開発されても、一度広まった耐性菌による感染症は減少せず、その感染症治療の困難さと医療経済的負担の大きさは変わらない。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。平成 13 年度は本研究班の 2 年目の研究となり、厚生行政、医療現場 (社会) で実際に活用できる成果を目指した。

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

カルバペネム系抗生物質は、緑膿菌感染症に切り札的抗生物質である。メタロ- β -ラクタマーゼ生産菌はカルバペネム耐性となる。過去の調査では、臨床分離緑膿菌から約 1%の頻度で IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼ生産カルバペネム耐性菌が分離された。2001 年に日本の 69 医療施設より分離された 505 株のグラム陰性桿菌メタロ- β -ラクタマーゼを調べた。これまで

の一般的な IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼの他に異なる新型の IMP-2 生産菌としてセラチア 1 株、アシネトバクター 4 株、緑膿菌 1 株、セラチア菌は IMP-1 型と IMP-2 型の両方を生産した。VIM-2 型生産菌として、12 株が検出された。これらのメタロ- β -ラクタマーゼの検出には、新規に開発したメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)を利用したディスク拡散法を利用し、その有用性を証明した。

生方公子

肺炎球菌及びインフルエンザ菌の β -ラクタム剤耐性(感受性)を PCR 法で迅速に検出する方法を新たに開発した。これを用いて、呼吸器感染症又は化膿性髄膜炎由来肺炎球菌 200 株、インフルエンザ菌 203 株について、 β -ラクタム剤耐性(感受性)を調べた。肺炎球菌は、各種の PBP 変異と β -lactam 剤耐性値の関係を PCR 法で検出可能とした。インフルエンザ菌は、PBP 変異、 β -ラクタマーゼ生産、及び PBP 変異と β -ラクタマーゼ生産の 3 種類の耐性機構による β -ラクタム耐性を PCR 法で検出可能とした。

井上松久

グラム陰性桿菌は、染色体に誘導型の classC β -ラクタマーゼ(AmpC)遺伝子を保有する。*Enterobacter cloacae* の Amp 型耐性遺伝子保有株の *in vitro* 高度 β -lactam 耐性変異株は、AmpC 生産量が増加し、AmpC 遺伝子の調節遺伝子に変異が存在した。メタロ- β -ラクタマーゼ生産菌はカルバペネム耐性となる。メタロ- β -ラクタマーゼの中で IMP 型は IMP-1~IMP-6 が報告されている。*S. marcescens* 由来 IMP-6 遺伝子には IMP-1 構造遺伝子の 640 番

目の塩基に変異が存在した。

山口恵三

Enterobacter cloacae, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*それぞれが生産する classC 型 β -ラクタマーゼのセフェム系薬剤 cefcapene に対する基質特異性及び安定性を生化学的に解析した。その結果、cefcapene は、これらの菌の classC 型 β -ラクタマーゼを特異的に不活化させることが解った。

堀田国元

MRSA の各種アミノグリコシド系薬剤耐性には、これまで 5 種類のアミノグリコシド修飾酵素(aad(4',4''), aad(9), aac(6'')/aph(2''), aph(3''), aaa(6))が知られている。MRSA の *mecA* 遺伝子、コアクラーゼ遺伝子及び 5 種類のそれぞれのアミノグリコシド修飾酵素を同時にコロニーから検出できる PCR 法(Multiples Colony Direct PCR 法)を開発した。80 年代から 90 年代に臨床分離された MRSA 230 株について、新規に開発した PCR 法を用いて調べた結果、MRSA の各種アミノグリコシド修飾酵素(アミノグリコシド耐性)を検出することができ、この方法が有用であることが証明できた。

後藤直正

Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌)は、種々の抗菌剤や消毒剤に自然耐性を示す。これには細菌細胞膜蛋白により構成される多剤排出機構による。この機構の機能は、基質の能動的輸送、排出基質の特異性の認識等を行う。これまで 5 種類の機構が解っている。そのうち 2 種類 MexAB-OprM 機構、及び MexCD-OprJ 機構について、それぞれの基質を認識する蛋白と考え

られている MexB、MexD 蛋白の遺伝子構造を、臨床分離緑膿菌 43 株について調べた。その結果、MexB 蛋白の遺伝子変異は検出できなかった。MexD 蛋白遺伝子は 5 種類の変異株が発見され、それぞれの変異株は元来 MexCD-OprJ 機構が認識する抗菌剤とは異なる抗菌剤を認識し、耐性となっていることが解った。これらの変異の遺伝子構造解析から、MexD 蛋白の基質を認識する蛋白の領域が解った。

中江太治

緑膿菌の抗菌剤に対する自然耐性機構の一つ、MexAB-OprM 排出機構の発現調節機構を解析した。MexAB-OprM は調節蛋白 MexR repressor により調節されている。MexA 蛋白の遺伝子の、アミノ末端領域の変異株の解析から、この領域に MexR 蛋白が結合するオペレーター部位が存在することが解った。

山本友子

2000 年 4 月から 2001 年 3 月の間に臨床分離されたグラム陰性菌 430 株、グラム陽性菌 331 株について、各種ニューキノロン耐性を調べた。緑膿菌の耐性菌分離率が最も高く 32% (38 株/118 株) で、*E. coli* 6% (8 株/133 株)、*K. pneumoniae* 2% (2 株/100 株) であった。グラム陽性菌では、*S. aureus* 70% (64 株/91 株)、*S. epidermidis* 45% (23 株/51 株)、*E. faecalis* 31% (42 株/51 株) であった。高度耐性 *E. coli* 8 株の耐性機構解析の目的で、キノロン剤標的酵素の DNA gyrase のサブユニット GyrA 遺伝子、及び topoisomerase IV のサブユニット ParC 遺伝子の変異をそれぞれ解析し、その変異部位を決定した。

和田昭仁

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、グリコペプチド系薬剤 (バンコマイシン、テイコプラニン) の中で、テイコプラニンに耐性化しやすい傾向がある。MRSA のテイコプラニン耐性に関連する遺伝子として、*tcaRAB* 遺伝子を同定した。*tcaRAB* から、*tcaR*、*tcaRA*、*tcaRAB*、*tcaA*、*tcaB* それぞれの遺伝子を含む断片をクローニングし、*tcaRAB* 欠損株 (テイコプラニン低感受性 12 µg/ml) との相補実験を行った。その結果、テイコプラニン感受性には *tcaA*、又は *tcaB* 遺伝子が必要であることが解った。

渡邊邦友

嫌気性菌 *Fusobacterium nucleatum* 110 株の各種薬剤感受性を、微量液体希釈法、寒天平板法、及び E テストで調べた。調べた薬剤は、ampicillin (ABPC) , piperacillin(PIPC), sulbactam/ piperacillin(SBT/PIPC), cefaclor (CCL), cefoxitin(CFX), cefotaxime(CTX), erythromycin(EM), clindamycin(CLDM), tetracycline(TC), ofloxacin(OFLX)の 10 薬剤である。3 つの方法で同じ結果は得られなかった。寒天平板希釈法の結果から、ペニシリン・セフェム系薬 6 薬剤に高度耐性 3 株、中等度耐性 3 株、ofloxacin 中等度耐性 2 株が検出された。

池 康嘉

輸入食品を介しての人への VRE の伝播を制御する目的で、タイ国立食品衛生局との共同で、タイ国養鶏環境における VRE 実態調査と VRE 制御対策を行った。タイ養鶏会社 20 社に属する Breeder farm、Hatchery、Broiler farm、Chicken meat、Chicken cloacal swab それぞれのサン

プルの VRE を調べた。サンプル当たり VRE の分離頻度は Breeder farm から 12%、Hatchery から 28%、Broiler farm から 14%、Chicken meat から 16%、Cloacal swab から 25% の頻度で VanA 型 VRE が分離された。その後、出荷後、床の敷藁交換の徹底、床の清掃及びグルテアルデヒド消毒薬で消毒を行った。その後、半年後の調査で、それぞれの sample からの VRE 分離率は 1%、4.6%、5%、1.3%、3% と減少していた。この研究で分離された VRE は全て VanA 型 VRE で、前に報告した日本のタイからの輸入鶏肉の VanA 型 VRE で発見される、*VanS* 遺伝子に 3 箇所の変異のある新型の VRE であった。

池 康嘉、荒川宜親

バンコマイシンは MRSA 感染症に対する特効薬である。1997 年に日本で最初にバンコマイシン低感受性（低度耐性）MRSA 及び低感受性株が生じやすいヘテロ耐性 MRSA が分離され、世界的に問題となった。1997 年に日本の 278 の医療施設から分離された 6,625 株の MRSA を異なる菌量 (10^4 /ml, 10^6 /ml, 10^7 /ml)、異なる培地 (Mueller Hinton, BHI)、異なる方法を用いて、バンコマイシンの MIC を精細に解析した結果、これらの MRSA はすべてバンコマイシン MIC は $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であり、問題となる株は存在しなかった。

D. 考察

本研究対象とした細菌はグラム陽性菌では、黄色ブドウ球菌、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌（表皮ブドウ球菌）、腸球菌、肺炎レンサ球菌、グラム陰性菌では、大腸菌を含む各種グラム陰性腸内細菌、及び緑膿菌、セラチア菌等の各種

ブドウ糖非発酵グラム陰性菌等である。薬剤耐性機構としては(1)不活化機構として、 β -ラクタム剤加水分解酵素 (β -ラクタマーゼ)、アミノ糖系抗生物質修飾不活化酵素、(2)排出機構として、緑膿菌の薬剤排出機構、(3)薬剤作用点（作用物質）の変異または変換として、キノロン耐性、MRSA、 β -ラクタム剤耐性肺炎レンサ球菌及びインフルエンザ菌、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 等で現在問題となっている菌種、耐性機構はすべてその研究対象とした。

日本はカルバペネムの使用量が世界で最も多い国である（世界の使用量の約 50%）。そのため、すべての抗生物質に効かないカルバペネム耐性緑膿菌、中でもメタロ- β -ラクタマーゼ生産菌（多剤耐性緑膿菌）の分離頻度が最も多く、増加傾向にある。多剤耐性緑膿菌感染症治療及び院内感染対策上、メタロ- β -ラクタマーゼによるカルバペネム耐性の簡便な迅速検出方法の開発が早急に望まれていた。メタロ- β -ラクタマーゼ検出のために新規に開発されたメルカプト酢酸ナトリウム（キレート剤）を利用したディスク拡散法（荒川）は、臨床検査室で簡便に迅速にメタロ- β -ラクタマーゼを検出可能とした点で、非常に画期的で有用な方法である。

β -ラクタム剤耐性肺炎レンサ球菌及び、インフルエンザ菌の耐性機構の基礎的研究に基づき開発された PCR 法を用いた。これらの耐性菌の検出方法（生方）は、これらの菌の耐性機構をも検出可能とした方法である。

MRSA 感染症治療には他薬剤との併用薬剤として、アミノ糖系抗生物質が使用されることがある。MRSA のアミノ糖系抗生物質耐性菌検出の

ために開発された各種アミノ糖不活化酵素検出用 PCR 法（堀田）は、黄色ブドウ球菌のコロニーからこれらの各種不活化酵素（耐性）を検出することが可能であり、臨床分離 MRSA を用いた研究においてこの方法が有用であることが実証された。

耐性菌を検出する方法開発のための基礎的耐性機構の研究として、グラム陰性菌の高度 β -ラクタム剤耐性の一つである染色体性 AmpC 耐性遺伝子の調節遺伝子変異によるもの、あるいはメタロ- β -ラクタマーゼの多様性がその遺伝子変異によるものであることを明らかにした（井上）。緑膿菌は多くの薬剤に自然耐性である。各種薬剤に対する自然耐性機構の薬剤排出機構は、まだ充分解明されていない。薬剤排出機構発現のための調節機構（中江）、及び薬剤排出機構の蛋白の機能を解明した（後藤）。MRSA の、*in vitro* のグリコペプチド（テイコプラニン）低感受性菌の耐性機構を解明するための遺伝学的研究がなされた（和田）。

疫学的調査研究として、臨床分離各種細菌のキノロン耐性の分離頻度（山本）、臨床分離 *Fusobacterium nucleatum* の各種抗菌剤に対する感受性（渡邊）の研究は、現在の耐性菌の疫学データとして有用である。

各種のグラム陰性菌が生産する classC 型 β -ラクタマーゼは、セフェム系薬剤 cefcapene により不活化される（山口）研究結果は、セフェム系薬剤による β -ラクタマーゼ阻害剤の開発に有用である。

我が国は、先進国あるいは東アジア各国の中で唯一 VRE が広がっていない国である。しかしながら、タイやフランス等の輸入鶏肉から高

頻度に VRE が分離される。またタイ産鶏肉から分離される VRE のバンコマイシン耐性遺伝子は、新しい型の遺伝子である。輸入鶏肉を介しての VRE が人に伝播することが危惧される。日本への鶏肉の主要輸出国であるタイの養鶏環境における VRE 制御対策（共同研究）により、タイ養鶏環境及びタイの輸出用鶏肉の VRE 検出率を顕著に減少させることができた（池）。

臨床分離 MRSA のバンコマイシン低感受性に関する調査研究結果（池、荒川等）は 2000 年に既に厚生省には報告済みであるが、この問題が日本を含め世界的に臨床現場で現在でも混乱を生じている問題であり、厚生省に報告後、国際専門誌への投稿を目的として詳細な研究解析を行い、その結果が J. Clin. Microb (2001, 39(12), 4445-4451) に掲載されたものである。

E. 結論

臨床現場で早急に簡便な迅速検出法が求められていた、カルバペネム耐性菌のメタロ- β -ラクタマーゼの検出法が開発され、実用化されたことは大きな成果である。また、PCR 法を用いた肺レンサ球菌、及びインフルエンザ菌の β -ラクタム剤耐性菌の PCR 法を用いた検出方法や、MRSA のアミノ糖系抗生物質耐性菌の PCR 法を用いた検出方法は、迅速検出のために実用可能な方法である。タイ国養鶏環境及び輸出用鶏肉の VRE 制御対策における制御効果は、我が国の輸入鶏肉の VRE 汚染制御に影響するものであり、厚生行政に役立つ結果である。MRSA のバンコマイシン感受性の全国調査の結果が国際専門誌へ掲載されたことは、日本発のこの問題に対する日本からの問題提起と批評論文であ

り、日本のみならず世界の臨床現場にこの問題に対する評価の指標を与えるものである。その他の基礎的、疫学的研究も、今後検出方法開発に向けて必要な研究である。

F. 研究成果等

- 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 38(1):40-3.
- Arakawa Y, Ike Y, Nagasawa M, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Yagi T, Kurata T. Trends in antimicrobial-drug resistance in Japan. *Emerg Infect Dis.* 2000 6(6):572-5.
- Fujimoto S, Ike Y. pAM401-based shuttle vectors that enable overexpression of promoterless genes and one-step purification of tag fusion proteins directly from *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol.* 2001 67(3):1262-7.
- Ike Y, Arakawa Y, Ma X, Tatewaki K, Nagasawa M, Tomita H, Tanimoto K, Fujimoto S. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. *J Clin Microbiol.* 2001 39(12):4445-51.
- Tsuchizaki N, Hamada M, Hotta K. Rapid characterization by colony direct PCR of distribution specificity in *Streptomyces* of *kan* gene encoding a specific aminoglycoside-3-N-acetyltransferase. *Actinomycetol.* 2001 15:23-9.
- Ubukata k, Chiba N, Hasegawa K, Shibasaki Y, Sunakawa K, Nonoyama M, Iwata S, Konno M. Differentiation of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* from other *H. influenzae* strains by a disc method. *J Infect Chemother.* 2002 8:65-74.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Nishino T. Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* mutant to beta-lactams due to reduced expression of the *ampC* beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 45(4):1284-6.
- Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 45(7):1964-71.
- Guan L, Nakae T. Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas*

aeruginosa. J Bacteriol. 2001
183(5):1734-9.

- Kuga A, Okamoto R, Inoue M. *ampR* gene mutations that greatly increase class C β -lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother. 2000 44(3):561-7.

その他研究成果は各班員の報告書の中に記載

G. 知的所有権の取得状況

なし

II. 分担研究報告書（平成13年度）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

カルバペネム耐性グラム陰性桿菌から分離された新しいタイプの

メタロ- β -ラクタマーゼ IMP-2 に関する解析

分担研究者 荒川 直親 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

研究要旨

IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌が臨床分離グラム陰性桿菌間に拡散しつつあることが懸念されている。近年、海外において VIM-2 型など新しいタイプのメタロ- β -ラクタマーゼ産生株が報告されているが、昨年度、我が国でも VIM-2 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生緑膿菌がはじめて検出された。そこで、2001 年に我が国の医療機関 69 施設において臨床分離され、感染研細菌・血液製剤部に耐性遺伝子の検査依頼のあった 505 株についてメタロ- β -ラクタマーゼの解析を行った。その結果、今年度は、IMP-2 型メタロ- β -ラクタマーゼを産生するセラチア 1 株、アシネトバクター 4 株、緑膿菌 1 株を新たに臨床分離株中より発見した。また、その遺伝子 *bla*_{IMP-2} は、クラス 1 のインテグロン構造に担われている事が明かとなった。

協力研究者

柴田尚宏、土井洋平、柴山恵吾、黒川博史
(国立感染症研究所 細菌・血液製剤部)

るカルバペネムまでも分解してしまうメタロ- β -ラクタマーゼ耐性菌の我が国の状況とそれらの遺伝子解析を目的とした。

A. 研究目的

IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼが報告されて、約 10 年が経過した。この間、我が国では、臓器移植、悪性疾患の治療など医療の高度化が一層進んでいる。同時にそのような患者におけるグラム陰性桿菌感染症とその耐性の問題が重要になりつつある。特に欧米で問題となっている ESBLs（基質拡張型 β -ラクタマーゼ）産生菌やメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌は、我が国でも学会等でさかんに報告されつつあり、臨床の現場での関心が高まってきていると言える。さらに近年海外で報告が相継いでいる VIM-2 型、IMP-2 型などの新型 β -ラクタマーゼによる耐性菌の現状は、不明な点が多い。

以上の背景を踏まえ、本研究では日本で臨床分離された菌株から、最後の頼みの網的存在であ

B. 研究方法

1. 菌株:

耐性遺伝子検査依頼のあった医療機関 69 施設の協力により、2001 年に臨床より分離されたグラム陰性桿菌 505 株を収集した。

2. メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)を利用したディスク拡散法

収集した菌株のうち CAZ 耐性または IPM 耐性株をメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)を利用したディスク拡散法にて第一次スクリーニングを実施した。

3. PCR による解析

IMP-1 型、IMP-2 型、VIM-2 型特異的プライマーを用い、SMA 法陽性株を PCR 解析した。

4. 遺伝子の塩基配列の決定

IMP-2 型、VIM-2 型産生株を疑う菌株に関して

は、クローニングにてその遺伝子と周辺構造を明らかとした。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトより分離された菌ではあるがヒト血清や組織等の臨床検体を使用しないため、倫理的な問題は発生しない。また、患者個人のデータは収集しなかったため、その点における倫理上の問題も発生しない。

C. 研究結果

1. 菌株

収集した菌株は、緑膿菌、アシネトバクター、セラチア、大腸菌、クレブシエラなど腸内細菌群、ブドウ糖非発酵菌群を含む多菌種にわたっていた。

2. メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)を利用したディスク拡散法およびPCR解析

SMA法にて陽性であったが、PCRにてIMP-1型陰性のものを中心にIMP-2型、VIM-2型の新型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子特異的プライマーを用いたPCR解析にて検査した。その結果、IMP-2型は、セラチア1株、アシネトバクター4株、緑膿菌1株検出された。また、VIM-2型産生株は、これまで緑膿菌のみだったが、新たに12株が検出された。さらにこのうち1株はIMP-1型とIMP-2型の両方陽性のセラチアであった。

3. IMP-2型とVIM-2型の遺伝子解析

IMP-1型とIMP-2型の両方が陽性のセラチアとVIM-2型陽性緑膿菌の遺伝子解析を行った。その結果、これらは伝達性プラスミド上に遺伝子が担われ、さらにそれぞれ独立したインテグロン構造に担われていることが明らかとなった。

D. 考察

IMP-2型産生株は海外で報告されているのは、アシネトバクターにおいてのみである。本研究

では、国内で初めてIMP-2型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株を分離した。そのみでなく、アシネトバクター以外の緑膿菌、セラチアにおいてもIMP-2型産生株を検出し、これらが腸内細菌群、ブドウ糖非発酵菌群に拡散されることが示唆された。また、このうちセラチアの1株において、IMP-1型、IMP-2型両方のメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を持つ株を検出したことは、今後このようなタイプの耐性菌の出現の増加が懸念される。VIM-2型産生株に関しては、我々が昨年国内で初めて確認し報告したが、今回の調査で、新たな株が分離された。こうした新型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の分離状況は、多府県におよんでおり、今後さらなる耐性菌の拡大が示唆された。一方、これらの遺伝子と周辺構造を解析した結果、IMP-2型、VIM-2型ともに伝達性プラスミド上に遺伝子がコードされており、さらに別々のインテグロン構造に担われていることが明らかとなった。このインテグロン構造、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子だけでなく、アミノグリコシド耐性遺伝子や消毒剤耐性遺伝子も遺伝子カセットとしてとりこんでおり、多剤耐性化の機構として注目されている。

E. 結論

IMP-2型メタロ-β-ラクタマーゼを産生するセラチア1株、アシネトバクター4株、緑膿菌1株を新たに臨床分離株中より発見した。

IMP-2型、VIM-2型などの新型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌は国内に分離されつつあり、今後さらなる拡散が危惧される。IMP-2型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌は、IMP-1型と同様、多剤耐性を示す傾向が強く、今後、臨床現場での監視が重要と考えられる。

F. 健康危険情報

今回の研究で、昨年度国内で初めて発見されたVIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株は、さらに複数県で分離された。また、IMP-2型産生株も今回初めて報告された。さらにこのうち1株は、

IMP-1 型と IMP-2 型の両方を産生する株であった。これらの新型のメタロ- β -ラクタマーゼは、伝達性のプラスミド上に遺伝子が担われており、菌種を超えた拡散が懸念される。また、IMP-1 型と同様にカルバペネムを強力に分解するだけでなく、アミノグリコシドなどにも多剤耐性を示す株が多く、今後もその分離動向に注意が必要と考えられる。

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、IMP-1 型 と IMP-2 型の 2 種類のメタロ- β -ラクタマーゼを産生するカルバペネム耐性セラチアの遺伝子解析、第 78 回日本細菌学会総会、岡山、4 月、2001
- b. 柴田尚宏、他、Molecular Epidemiology of Metallo- β -Lactamases Among Gram-negative Rods Detected by Thiol Compounds in Japan., American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2001, Oland, USA
- c. 荒川宜親、他、Detection of VIM-2 Metallo- β -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* by Thiol Compounds in Japan., American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2001, Oland, USA
- d. 柴田尚宏、他、我が国における IMP-1 型、IMP-2 型、VIM-2 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の検出状況、第 49 回日本化学療法学会総会、横浜、5 月 31 日、2001 年
- e. 柴田尚宏、他、IMP-1 を含むメタロ- β -ラクタマーゼ産生 *Chryseobacterium* の検出状況、第 48 回日本化学療法学会東日本支部総会、東京、10 月、2001 年

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

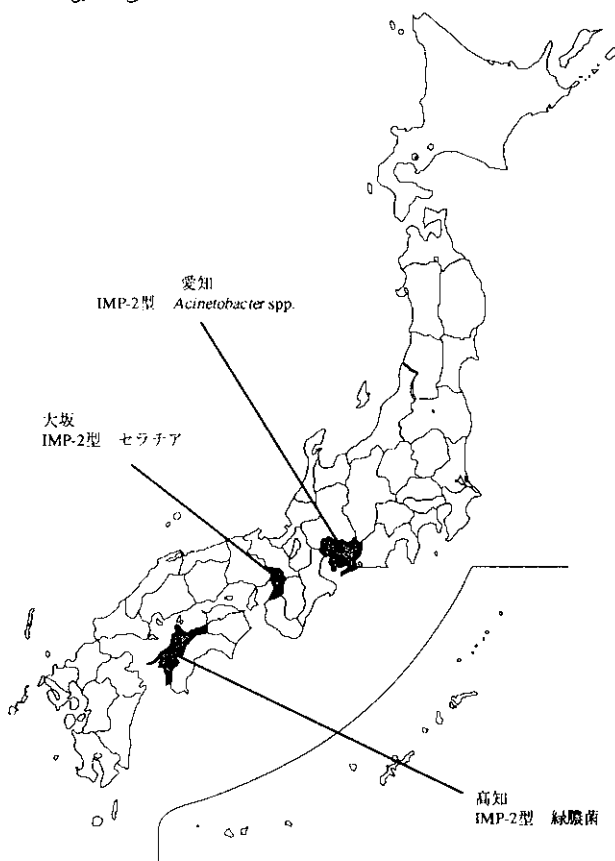


図 1 IMP-2 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の分布

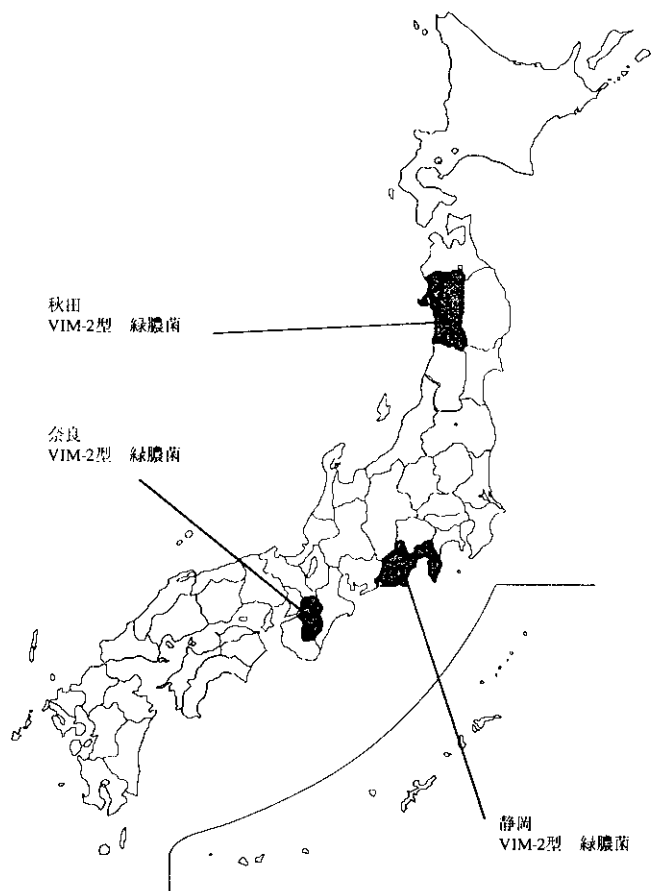
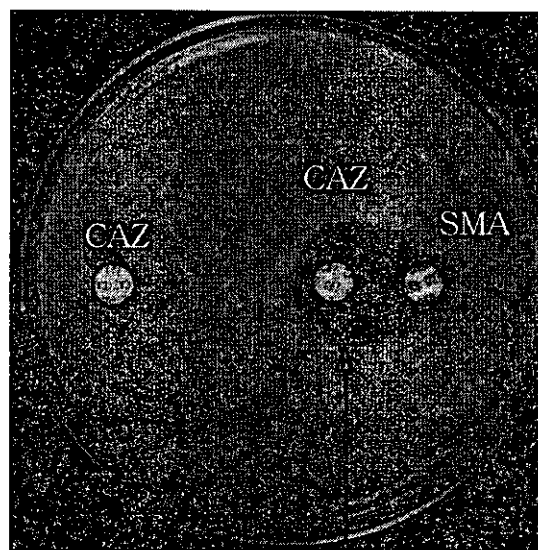
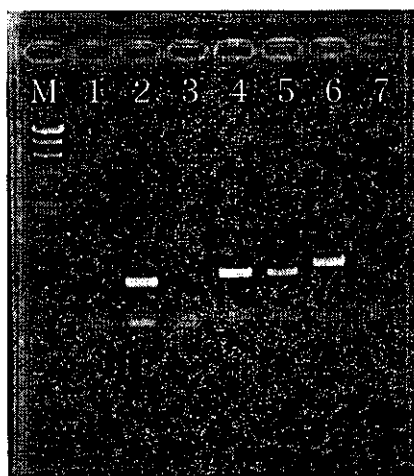


図2 VIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の分離地域



SMAによるメタロ-β-ラクタマーゼ阻害によりCAZに感受性となり発育止円が出現する。
 CAZ:セフトジジム
 SMA:メルカプト酢酸ナトリウム

図3 SMA法による検出法



M: マーカー
 1: 陰性対照
 2: IMP-1陽性対照
 3: 試験株
 4: IMP-2陽性対照
 5: 試験株
 6: VIM-2陽性対照
 7: 試験株

図4 IMP-1型、IMP-2型、VIM-2型特異的プライマーによるPCR解析
 (写真は、IMP-2型陽性例)

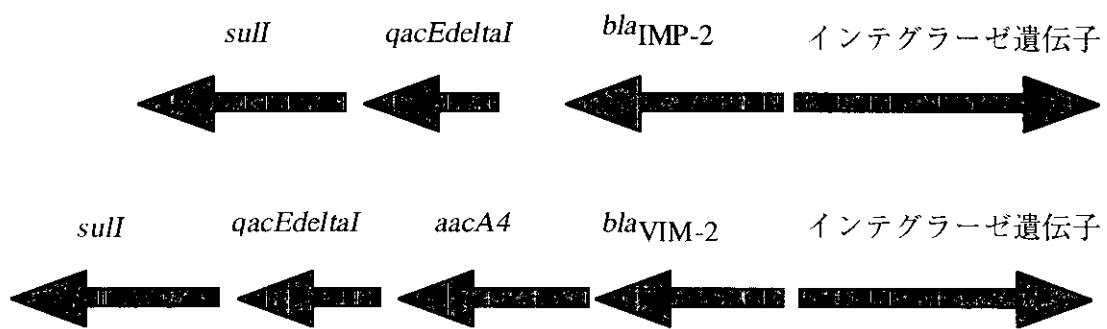


図5 IMP-2型とVIM-2型のインテグロン構造

sulI:サルファ剤耐性遺伝子、*qacEdeltaI*:消毒剤耐性遺伝子、