

鶏肉における VRE 汚染を制御する目的で、タイ国内の養鶏環境における VRE 調査と、養鶏環境における VRE 制御対策を行った。養鶏においては Breeder farm (産卵場) における採卵、Hatchery (孵化場) における鶏卵からの鶏の孵化、broiler farm (養鶏場) における肉用鶏への養鶏、Slaughter house での鶏肉生産の過程がある。これらの過程の環境、又は鶏肉のすべてにおいて VRE が 20~30% の高頻度に分離された。輸出用鶏肉からの VRE の分離頻度は約 20% で、これは我が国のタイ輸入鶏肉から分離される VRE の検出頻度の 20% とほぼ同じ頻度であった。これらの結果は、タイの養鶏環境が VRE によって高頻度に汚染されていることと、また、タイ国ではアボバルシンの使用は 1998 年に禁止されているが、一度広がった汚染は長期にその影響が残存することを示している。VRE が分離される養鶏環境において、繰り返し清掃及び消毒を行った後の養鶏環境、及び鶏腸管内糞便、鶏肉の VRE は、それぞれ調査検体当たり数%まで著しく減少した。このことは、養鶏においてアボバルシンを使用していない環境においては、清掃及び一般的な消毒等の抗細菌学的対策を行うことにより、VRE の数を減少させることが可能であることを示している。

分離された VRE 758 株の中から異なるサンプルから分離された 247 株について細菌学的解析を行った。含有プラスミドの解析、DNA の pulsed field gel electrophoresis の解析から、同じ株の VRE が多く存在することが解った。これは産卵場における産卵から、鶏

肉に至る一連の過程で、複数の同じ会社の系列で行われており、同じ系列における異なる養鶏環境の検体からは、同一の菌が分離されていることが推測される。調べた VRE の多くは高度バンコマイシン低度テイコプラニン耐性であった。また、ある株はバンコマイシン、テイコプラニン共に高度耐性を示した。いずれの耐性値を示す VRE も VanA 遺伝子の *vanS* 遺伝子の異なる 3 ヶ所に野生型 VanA VRE と異なるアミノ酸の変異が存在した。この変異は、日本でタイ産輸入鶏肉から分離される VanA 型 VRE に特異的な変異である。

平成13年度厚生科学研究

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（H12-新興-19）

班会議 日 時：2001年12月10日（月）1：00 P.M.

場 所：東京都新宿区戸山一丁目23番1号

国立感染症研究所 共用第1会議室

## 演 題

## 氏 名

1. ニューキノロン薬耐性菌の耐性遺伝子の解析並びにメカニズムに関する研究 山本友子
2. 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  
堀田国元  
- Multiplex Colony Direct PCR による MRSA のアミノグリコシド耐性遺伝子プロファイルの迅速解析 -
3. MexAB-OprM 排出ポンプの発現機序:オペレーター・プロモーター解析 中江太治
4. 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 後藤直正
5. 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解析とその迅速診断法に関する研究 生方公子
6. 黄色ブドウ球菌のテイコブラニン感受性に影響を与える因子の解析 和田昭仁
7. 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  
第二報 Fusobacterium の抗菌薬感受性測定法の検討と抗菌薬耐性の現況 渡邊邦友
8.  $\beta$ -lactam 薬加水分解酵素( $\beta$ -ラクタマーゼ)産生菌等の検出法の検討 井上松久
9. CefcapeneはクラスC  $\beta$ -ラクタマーゼを不活化する 山口恵三
10. 各種グラム陰性桿菌においてメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)-ディスク拡散法によるスクリーニングで検出した多様なメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの分子解析 荒川宜親
11. バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)とバンコマイシン耐性拡散要因及びバンコマイシン低感受性 MRSA 池 康嘉
12. The clinical, environmental, and agricultural isolates in Korea in recent years. Lee Yeonhee  
(李 蓮姫)

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

分担研究者：千葉大学大学院薬学研究院 山本 友子

(目的) ニューキノロン薬は、広い抗菌スペクトラムと強い抗菌力により、最も繁用されている抗菌薬のひとつであるが、近年、臨床材料から分離される多くの菌種にニューキノロン耐性株が認められ、臨床上的問題となっている。そこで、本研究は臨床分離ニューキノロン耐性菌のレファレンス化をめざして、耐性遺伝子の解析並びに耐性メカニズムに関する研究を行う。

(方法) 2000 年 4 月、2001 年 3 月に都内の医療機関中央検査室において種々の臨床材料より分離されたグラム陽性菌 331 株及び陰性菌 430 株に対するニューキノロン薬 (LVFX; levofloxacin, SPFX; sparfloxacin, GFLX; gatifloxacin) の MIC を寒天平板希釈法で測定した。又、その他 25 種の抗菌薬の MIC を微量液体希釈法を用いて測定した。キノロン標的酵素として知られている DNA gyrase と topoisomerase IV のそれぞれ遺伝子である *gyrA* と *parC* のキノロン耐性決定領域 QRDR を含む DNA を PCR により増幅し、塩基配列を解析することにより標的酵素の変異を検出した。

(結果と考察)

- (1) ニューキノロン耐性グラム陰性菌の比率は、*Escherichia coli* で 6 % (8 株/133 株)、*Klebsiella pneumoniae* で 2 % (2 株/100 株)、*Pseudomonas aeruginosa* で 32 % (38 株/118 株)であった。分離された耐性 *E. coli* に対する MIC はすべて 16  $\mu\text{g/ml}$ ~64  $\mu\text{g/ml}$  の高値を示した。又耐性 *P. aeruginosa* の中で MIC 64  $\mu\text{g/ml}$ ~512  $\mu\text{g/ml}$  を示す高度耐性菌は全体の 73 % を占めており、かなりのスピードで高度耐性化していると考えられた。一方、検査総数は少ないながら、耐性比率の高いものは、*Citrobacter koseri* 84 % (11 株/13 株)、*Serratia marcescens* 23 % (5 株/21 株)、*Proteus mirabilis* 15 % (3 株/20 株)であった。特に *P. mirabilis* で MIC 1024  $\mu\text{g/ml}$  を示した高度耐性菌は、調べた限り他の抗菌剤に対し感受性を示した。
- (2) ニューキノロン耐性グラム陽性菌の比率は、*Staphylococcus aureus* で 70 % (64 株/91 株)、*Staphylococcus epidermidis* で 45 % (23 株/51 株)、*Enterococcus faeculis* で 31 % (47 株/151 株)であった。いずれの場合も高度耐性菌であり、ブドウ球菌をはじめとするグラム陽性菌に対する抗菌力が増強された新薬である *gatifloxacin* に対してもすでに高度耐性となっていた。中でも *S. aureus* の高度耐性化が突出していた。
- (3) 高度耐性 *E. coli* 8 株の耐性機構を明らかにするために、まず *gyrA* の QRDR を含む領域の塩基配列を解析したところ、すべての耐性菌において、従来知られている 83Ser→Leu の変異、87Asp→Lys or Asn への変異が観察された。さらに *ParC* の QRDR を含む領域の塩基配列を解析したところ、83Ser→Ile or Arg の変異、84Glu→Lys に加え、新たな変異部位として 57Ser→Thr、108Ala→Thr or Val、127Lys→Glu が確認された。これらの高度耐性菌は 1 株を除いて、すべてが ABPC、PIPC 高度耐性であり、その中の 1 株は AZT 耐性であった。又 GM 耐性菌も含まれていた。ニューキノロン耐性の主たる原因としては、標的酵素の変異に加え、キノロン排出ポンプが知られている。排出ポンプ阻害剤を用いた簡便な耐性メカニズムの検討が来年度の課題となる。さらに、*P. aeruginosa* ならびに *S. aureus* の高度耐性菌の耐性メカニズムの解析も併せて来年度の研究課題とする。

平成 13 年度研究班会議(12/10/01):

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

— Multiplex Colony Direct PCR による MRSA のアミノグリコシド耐性遺伝子プロフィールの迅速解析 —

分担研究者 堀田国元 国立感染症研究所生物活性物質部

研究協力者 石川淳、石野敬子、土崎尚史、斎藤文子

【目的】コロニーから微量菌体を直接 PCR 反応液に添加して反応を行う Multiplex colony direct PCR 法<sup>1)</sup>により、1980 年代および 1990 年代後半に臨床分離された MRSA 約 230 株を対象として MRSA においてこれまで知られている 5 種のアミノグリコシド修飾酵素遺伝子(AME)プロフィールを解析し、アミノグリコシド(AG)耐性と の相関性を明らかにするとともに AG 耐性のレファレンス因子を特定する。

【方法】検出標的の AME 遺伝子は *aad(4',4'')*, *aad(9)*, *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-III* および *aad(6)* の 5 種で、PCR 増幅サイズは 174bp, 1000bp, 407bp, 269bp 及び 750bp に設定した。*mecA* の増幅サイズは 519bp とした。PCR 反応液組成は、DNA ポリメラーゼとして KOD-plus-を用い、*aac(6')/aph(2'')* 用のプライマー濃度を 0.5  $\mu$ M (他は 0.2  $\mu$ M)とした以外は TOYOBO のプロトコルに従った。PCR は 95°C, 3 分 → (95°C, 30 秒 → 50°C, 30 秒 → 68°C, 1 分) × 30 回 → 68°C, 3 分 → 室温を基本条件とした。また、コアグラーゼ遺伝子(*coa*)について N 末端付近の繰り返し領域を PCR 増幅後 *AluI* 切断し多型解析(RFLP)を行った。AG 耐性は、Kanamycin 系 4 種(KM, DKB, AMK, ABK)と Gentamicin 系 4 種(GM, SISO, NTL, ISP)について調べた。

【結果】標的遺伝子の増幅を 2 群に分けて PCR を行うとすべての遺伝子は問題なく増幅・検出できた。*mecA* を含め 6 種の遺伝子すべてのプライマーを添加した条件では、*aad(6)* 遺伝子(750bp)の増幅が特異的に不安定だったことを除いてその他の AME 遺伝子 4 種と *mecA* の計 5 種の遺伝子をクリアーに再現性良く検出できた。約 230 株(50 株は 80 年代、残りは 90 年代後半)の MRSA における AME 遺伝子のプロフィールを調べた結果をもとに上記 AG 耐性に関与する *aad(4',4'')*, *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-III* はの 3 種の AME 遺伝子の分布と AG 耐性の間に以下のようなことが認められた。

AME プロフィール	80 年代(50 株)	90 年代(180 株)	AG 耐性
1) <i>aad(4',4'')</i> のみ	22%	53%	KM, DKB, AMK 及び ISP
2) <i>aad(4',4'')</i> と <i>aac(6')/aph(2'')</i>	30%	42%	ABK(一部耐性)除くすべて
3) <i>aac(6')/aph(2'')</i> のみ	40%	4%	ABK・ISP(一部耐性)除くすべて
4) <i>aac(2')/aph(2'')</i> と <i>aph(3')</i>	8%	1%	同上

コアグラーゼ遺伝子 RFLP 型

1)L21	36%	93%	90 年代菌株の一部に ABK 耐性
2)L31	34%	2%	
3)M22	22%	3%	80 年代も 90 年代にも ABK 耐性

【考察】AME プロフィールと AG 耐性の高い相関性から、依然として AME が主要な AG 耐性因子であることが認められた。ABK 耐性に関して、*aac(6')/aph(2'')* は必要であるが、必要十分ではなく、宿主のコアグラーゼ RFLP 型との相関性から未知の要因の存在が考えられた。また、ABK 耐性化はほとんど進行していない。

1) Tsuchizaki N, Ishikawa J, Hotta K.: Jpn. J. Antibiot. 53(6): 422-429 (2000).

## コロニーダイレクト PCR による MRSA アミノグリコシド耐性遺伝子プロファイルの迅速解析

○ 土崎尚史、堀田国元(国立感染研・生物活性)

[目的] MRSA コロニーから微量の菌体を直接 PCR 反応液に添加して反応を行うコロニーダイレクト PCR 法<sup>1)</sup>によって MRSA で知られている 5 種(すべて)のアミノグリコシド修飾酵素(AME)遺伝子プロファイルを *mecA* 遺伝子とともに一度に解明する条件の確立を目指した。

[方法] 検出標的の AG 修飾酵素遺伝子は *aad(4;4'')*, *aad(9)*, *aac(6')/aph(2'')*, *aph(3')-III* および *aad(6)* の 5 種で、設計した PCR 増幅サイズは 174bp, 1000bp, 407bp, 269bp 及び 750bp である。*mecA* の増幅サイズは 519bp に設計した。PCR 反応液組成は、DNA ポリメラーゼとして KOD-plus-を用い、*aac(6')/aph(2'')* 用のプライマー濃度を 0.5  $\mu$ M (他は 0.2  $\mu$ M) とした以外は TOYOBO のプロトコルに従った。PCR は 95°C, 3 分→(95°C, 30 秒→50°C, 30 秒)→68°C, 1 分)×30 回→68°C, 3 分→室温を基本条件とした。

[結果] 標的遺伝子の増幅を 2 群に分けて PCR を行うとすべての遺伝子は問題なく増幅・検出できた。*mecA* を含め 6 種の遺伝子すべてのプライマーを添加した条件では、*aad(6)* 遺伝子(750bp)の増幅が特異的に不安定だったことを除いてその他の AME 遺伝子 4 種と *mecA* の計 5 種の遺伝子はクリアーに再現性良く増幅・検出された。約 230 株(50 株は 80 年代、残りは 90 年代後半)の MRSA における AME 遺伝子プロファイル調べた結果、コアグラーゼ遺伝子の多型解析(RFLP)との関係において年代間での変動が認められた。

[考察] コロニーダイレクト PCR は MRSA の遺伝子プロファイル解析のための迅速簡便な方法として有用なことが明らかにできたが、個々のプライマーに問題がないにもかかわらず、すべてを混合すると *aad(6)* 遺伝子増幅が特異的に不安定な結果になった原因については検討中である。

1) Tsuchizaki N, Ishikawa J, Hotta K.: Jpn. J. Antibiot. 53(6): 422-429 (2000).

SCCmec 中に位置する aad(4',4'')と aad(9)の両方を持つ菌株の比率は、80 年代が 36%、90 年代が 91%(いずれもコアグラーゼ RFLP 型が同じ)であった。aad(4')を欠く菌株は 80 年代が 38%、90 年代が 7%で、aad(9)を欠く菌株は、80 年代菌株で 18%、90 年代菌株で 3%であった。aph(3')と aad(6)をもつ菌株の頻度は頻度が低かった。aac(6'')/aph(2'')を持つ菌株は 80 年代が 76%、90 年代が 45%であった。

[考察]上記の方法は、MRSA の AME 遺伝子プロファイルの迅速簡便検出法として評価できる。

一つの MRSA 菌株が 5 種の AG 修飾酵素遺伝子すべてをもってケースはこれまで見つかっていない。そこで、組み合わせによって 5 種の遺伝子をカバーできる 2 つの菌株を添加する非常に簡便な手法である。この操作により、PCR 反応の鑄型としては充分量の DNA が反応液に導入される。これを multiplex PCR にする事で上記 5 遺伝子の同時検出が可能になった。また、*Staphylococcus aureus* の多型解析の一手法である *coagulase* 遺伝子 3'-末端繰り返し領域の *AclI* 消化による RFLP 解析についても、コロニーダイレクト PCR 法を用いる事により迅速化を図ることができた。

従来の PCR 法と比べ、菌体から別個に DNA を抽出する操作が不要なため時間的、経済的コストの削減につながる上、菌体であれば新鮮なもの、保存を経たものの区別無く検出を行なう事が可能である。また、PCR を行なう設備が整っていれば、特別な技術や試薬等を追加する必要が無い。

これらの点から、コロニーダイレクト PCR を用いる事により、多数の臨床分離 MRSA について短時間に、かつ簡便にアミノグリコシド耐性遺伝子の有無や菌株の多型等の多くの情報を得る事ができ、特に急を要する実際の現場では非常に有用な手法であると思われる。

## MexAB-OprM 排出ポンプの発現機序：オペレーター・プロモーター解析

東海大学医学部 分子生命科学 中江太治・斉藤孝二郎

緑膿菌は抗菌剤に対して非特異的自然耐性を示すことは良く知られている事実である。この非特異的抗生物質自然耐性には MexAB-OprM 排出ポンプの低レベルの発現及び外膜の低透過性が係っている。また一方、*nalB* 型変異株では同じスペクトルの抗菌物質に対して野生株より更に高度耐性となる。この原因は MexAB-OprM 排出ポンプの高発現によるものである。本研究ではこの広域スペクトル抗菌物質に対する低レベル及び高レベル耐性の機序を明らかとしたので報告する。

MexAB-OprM ポンプの発現は MexR リプレッサーによって抑制されていることはすでに報告してきた。野生株における低レベル発現にも MexR リプレッサーが係っているものと考え次の様な実験を行った。MexR をプラスミドから高発現すると野生株緑膿菌は MexAB-OprM ポンプ欠損株に近い抗生物質感受性を示した。この事実は野生株における MexR の濃度は高くない事を物語っている。次に MexR 蛋白を均一にまで精製し MexR 蛋白と MexR-MexA の間の断片 DNA (MexOP) との結合実験を行ったところ、MexR はこの断片と特異的に結合することが明らかとなった。次に MexA のアミノ末端近くをコードする DNA に *lacZ* を融合させ MexOP を MexA 側から徐々に削った。その結果 MexOP が MexR 側から約 87bp の位置まで削られた時 *lacZ* の読取りが脱抑制を受けた。このことから MexR は *mexR* の読取り開始点から MexA 方向に約 90bp 位の位置に結合するものと解釈できた。更に MexOP を約 30bp まで削ると *lacZ* の活性は低下した。従って RNA ポリメラーゼはこの位置に結合するものと解釈できた。

これらの結果から MexR は MexOP に結合し、RNA ポリメラーゼは MexA 側から遠位に結合するものと解釈できた。ところが *mexR* の読取りは MexA と反対方向に読まれるので、*mexR* を読取るためには RNA-ポリメラーゼ結合サイトは MexA に近位に位置していなければならない。従って *mexR* の読取りは MexR 濃度に依存することになり MexR が *mexR* の読取りを完全に抑制することはできない。このことは取りも直さず MexR は MexAB-OprM の読取りを完全に抑制できないことになり、野生株緑膿菌では MexAB-OprM ポンプが低レベルに、リーキーに発現されることとなる。

## 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

京都薬大・微生物 後藤直正、佐藤剛章、諏訪雅宣、村田 健、西野武志

緑膿菌の染色体上には、基質特異性の異なるマルチコンポーネント型多剤排出システムが少なくとも 5 種類コードされている。これらの排出システムは基質の能動的輸送と基質特異性の決定に機能する RND 型内膜タンパク質と外膜タンパク質およびそれらにリンクするペリプラスム・タンパク質から構成され、これらの発現が基質特異性に応じた多剤耐性化をもたらす。緑膿菌の多剤耐性化の現状の把握やさらには耐性化を防止する一方策として、排出システムの阻害化合物の検索や開発は必要である。しかし、そのためには排出システムの作動機構の解明や実験室株で明らかにした基質特異性が臨床分離株にも合致するかどうかを明らかにする必要がある。そこで、臨床分離株から MexAB-OprM システムおよび MexCD-OprJ システムの RND タンパク質 MexB および MexD をコードする遺伝子をクローン化し、それらの基質特異性を調べると同時に基質特異性に寄与するアミノ酸変異を同定した。

PAO1 株の PCR により臨床分離緑膿菌計 43 株から *mexB* および *mexD* 遺伝子を増幅し、*E. coli*-*P. aeruginosa* shuttle vector の *lacI*<sup>q</sup>-*Ptac* 下流に挿入した。こうして作成した *mexB* 発現プラスミドを用いて KG4509 (MexA<sup>+</sup> OprM<sup>+</sup>; *mexR*::*omagaSm*  $\Delta$ *mexB*  $\Delta$  (*nfxB* -*mexCD-oprJ*) *mexXY*) の形質転換を、また *mexD* 発現プラスミドを用いて KG4501 (MexC<sup>+</sup> OprJ<sup>+</sup>; *mexR*::*omagaSm*  $\Delta$ (*mexAB-oprM*)  $\Delta$  *mexD*) を形質転換した。その後、抗 His-tag 抗体を用いた Western immunoblot により *mexB* および *mexD* の発現が確認できた株の抗菌薬感受性を調べたところ、*mexB* または *mexD* の発現によってノルフロキサシン、スパフロキサシン、セフピロム、ペニシリン、モノバクタム、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、エリスロマイシンのいずれかに対する耐性化が見られた株はともに 25 株あった。これらの株のうち、基質特異性の変化した株を *mexD* の場合には 5 クローン取得することが出来たが、*mexB* の場合には全く得ることは出来なかった。これらの結果から MexB の基質特異性は MexD に比べて安定であることが分かった。野生株でも発現し、緑膿菌の抗菌薬自然耐性の一因である MexAB-OprM の基質特異性が調べた限りで安定であることは阻害薬の創製のみならず排出システムの発現の防止策を考案するうえでも重要な情報であると考えられる。

こうして得られた *mexD* 変異体のうち、カルベニシリンおよびアズトレオナムにまで基質域が拡張した *mexD* 変異体の DNA 塩基配列を調べたところ、6 ケ所のアミノ酸置換が推定された。これらの変異のうち、基質特異性に寄与する変異を部位特異的変異導入法により調べたところ、Ser<sup>281</sup>Leu および Phe<sup>613</sup>Ser の変異が原因であることが分かった。さらに PAO1 由来の *mexD* をクローン化したプラスミドを保持した KG4501 からカルベニシリン耐性株を分離し、その *mexD* 配列を調べたところ、新たに Ala<sup>292</sup>Val、Pro<sup>328</sup>Leu の変異が同定された。これらの変異部位を MexD の推定二次構造に当てはめたところ、MexD や MexB が属する RND 排出タンパク質に特徴的な大きな二つのペリプラスム・ループのうち PL1 の膜貫通部位付近に Ser<sup>281</sup>Leu、Ala<sup>292</sup>Val および Pro<sup>328</sup>Leu が、PL4 に Phe<sup>613</sup>Ser が同定された。膜貫通部位付近に基質認識に寄与するアミノ酸変異が同定されたことは RND 排出タンパク質による基質認識にループ領域が寄与していることを示している。これらの結果は、排出機構の阻害薬の創製に有益な情報であると期待できる。

分担研究課題：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解析とその迅速診断法に関する研究

分担研究 生方 公子（財）微生物化学研究所

〔目的〕本邦においては、市中に発生する細菌性呼吸器感染症や化膿性髄膜炎例から分離される頻度の高い肺炎球菌やインフルエンザ菌において、耐性化が急速に進行している。その背景には、耐性菌増加の選択的圧力となっていると思われる抗菌薬の不適切な使用、血清型 b のインフルエンザ菌に対するワクチン接種の未実施、社会的環境要因の変化等が指摘されている。

抗菌薬の適切な使用には、短時間で検出菌の感受性を判断できる手法が必要である。このようなことから、私達は短時間に高い精度で検出菌の感性/耐性を識別できる「PCR 迅速診断キット」を構築してきたが、耐性化の進行と共に、遺伝子変異と感受性結果とが不一致の株が散見されつつあった。PCR の精度を一定に保つためには、当該菌株の遺伝子解析を行い、primer を再構築して使用に耐えうるものに改良していく必要があり、今年度はそのことを重点目標とした。

#### 〔方法と結果〕

1) 対象菌株：平成 12 年 11 月以降、本年 10 月までの 1 年間に全国の細菌検査室から送付を受けた菌株を対象とした(呼吸器由来:肺炎球菌 248 株,インフルエンザ菌 178 株,化膿性髄膜炎由来:肺炎球菌 116 株,インフルエンザ菌 183 株)。

2) primer の設計：肺炎球菌の  $\beta$ -ラクタム系薬耐性を識別する primer の再構築は、感受性と PCR の結果とが不一致の株について *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* 遺伝子解析を実施した。その結果、*pbp1a* に使用していた primer が新たに出現した保存性アミノ酸配列の STMK 中の T→S 変異を検出できていなかったと判断された。このため、従来の sense 側 primer をそれらの耐性菌に対応できるよう再設計した。インフルエンザ菌の  $\beta$ -ラクタム系薬耐性については、本邦で特異的に増加している PBP3 変異による BLNAR を軽度耐性(Low-BLNAR)と明らかな耐性(BLNAR)に識別できる primer を設計した。

#### 3)精度：

①肺炎球菌;本邦で分離される肺炎球菌に対し、従来の 98.3%の精度から、新たな primer では 99.6%の精度となった。新規 primer の組み合わせにより、呼吸器ならびに化膿性髄膜炎例由来の肺炎球菌における遺伝子変異の内訳が明確に出来たと考えている。遺伝子学的にみた PRSP の割合は 40.7%, PISP46.3%で、PSSP は 13.0%前後と考えられる。

②インフルエンザ菌:再構築した primer の耐性インフルエンザ菌に対する検出精度は 95%台であった。その理由は、一部の耐性菌に見いだされる変異を感性菌から識別することができないことであった。現行の PCR でも同時に 6 遺伝子を検索しており、これ以上 primer を増やすことは困難であり、また、それらは耐性度の低い株であることから、临床上は問題ないと判断している。なお、新たな primer による耐性菌の割合は、BLNAR が 14.9%, Low-BLNAR が 29.2%,  $\beta$ -lactamase 産生と PBP 変異の両メカニズムを有する株が 2.6%であった。

〔考察〕PCR によって識別される耐性菌に対し、現在上市されている経口抗菌薬や注射用  $\beta$ -ラクタム系薬の多くは抗菌活性を保持しておらず、そのことが耐性菌増加に繋がっていると推察される。検出菌の耐性/感性を迅速に識別し、最適な抗菌薬を選択することが、临床上後遺症を残さずに救命出来、なおかつ cost effective の視点からも求められているが、ここで報告した PCR 法は临床上有用な方法と考えている。

## 黄色ブドウ球菌のテイコプラニン感受性に影響を与える因子の解析

国立感染症研究所 細菌部 和田昭仁

本研究では、黄色ブドウ球菌にグリコペプチド耐性をもたらす因子を遺伝学的に解析する目的で、薬剤としてテイコプラニンを用いている。これは、黄色ブドウ球菌はテイコプラニンに対してバンコマイシンより高度耐性化しやすく、*in vitro*での耐性菌の分離が簡単なためである。また、対象とする菌は臨床分離株ではなく、最近、オクラホマ大学において全ゲノム配列が決定された NCTC8325 株、並びにこの株と同じ restriction 系を有する COL 株からの耐性菌変異株を用いている。この菌、並びにこの菌由来株で形質転換、形質導入が可能なことと、ゲノム配列に基づくさまざまな情報が利用できるからである。昨年の研究では、COL 株からトランスポゾン挿入株ライブラリーを作成し、この中からテイコプラニンに対して感受性が低下している菌(MIC 12 mg/L)を分離し、この菌において、破壊されている遺伝子を *tcaA* と名づけた。また、同時に分離した別のテイコプラニン低感受性株 BB1372 株(MIC 12 mg/L)においては、*tcaA* とともにこの遺伝子上流と下流の遺伝子を含む部分、*tcaRAB* が欠失していることを見つけたが、*tcaRAB* はオペロンをなしていたため、*tcaR*、*tcaA*、*tcaB* のどの遺伝子の欠失がテイコプラニン感受性に最も影響を与えるかを明らかにする必要がある。本年は、COL 株から *tcaR*、*tcaRA*、*tcaRAB*、*tcaA*、*tcaB* の各々を含む断片をクローニングし、*tcaRAB* 欠失株において、これらがプラスミド上に存在する条件で相補実験を行った。BHI をもちいた MIC 測定結果 (mg/L)を以下に示す。

		vancomycin	teicoplanin
BB1372	( <i>ptcaRAB</i> )	3	2
	( <i>ptcaR</i> )	3	12
	( <i>ptcaAB</i> )	3	2
	( <i>ptcaA</i> )	3	2
	( <i>ptcaB</i> )	3	3
	(pAW17)	4	12

以上より、*tcaRAB* オペロンのうちテイコプラニン耐性に最も影響を与えるのは *tcaA* であるが *tcaB* 単独でも耐性の回復が見られ、また *tcaR* はこの条件では耐性に影響を与えないことが判明した。

今後、テイコプラニンならびに TcaA に対する抗体を作成し、その機能解析を行う予定である。

## 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

### 第二報 Fusobacterium の抗菌薬感受性測定法の検討と抗菌薬耐性の現況

渡邊邦友<sup>1</sup> (研究分担者)、田中香お里<sup>1</sup>、川村千鶴子<sup>2</sup>、中村敏彦<sup>2</sup>、貝森光大<sup>2</sup> (研究協力者)

<sup>1</sup>岐阜大学医学部附属嫌気性菌実験施設、<sup>2</sup>青森県立中央病院検査部

#### 目的

Fusobacterium spp. 感染症のわが国における実態を明らかにする目的で、二次医療施設のモデル施設として、青森県立病院の検査部の協力の下で、分離培養方法を今日の臨床嫌気性菌学における最高水準に設定し、臨床検体の細菌学的解析を行い、1995年から1999年の5年間の成績を集計した。その結果、Fusobacterium 感染症は、年間平均約20例が認められたこと、また、化学療法学会標準法の一つ微量液体希釈法では、Fusobacterium の95株中の32株(34%)のMICを求めることができないことが明らかになった。このことは、Fusobacterium の耐性の現況を追跡することが難しいことを示している。今回、F. nucleatum の50株について寒天平板希釈法(ADT法)とEtestで薬剤感受性を測定し、その成績を解析した。

#### 成績

ADT法では、NCCLSの感受性側のBPを用いた場合、F. nucleatum は、自然耐性を示す薬剤であることがわかっているEMを除く9薬剤で、90~100%の範囲の感性率を示した。TCとCLDMには耐性株は認められなかった。PC系3薬剤には10%に、セフェム系3薬剤には6~10%に、OFLXには4%に耐性株が認められた。

Etestでは、判定に際し阻止帯が鮮明に現れない株が2~46%の範囲で認められ、これらについては、試薬供給元の推奨する発育を完全に阻止する点(Endpoint H)での判定に加え、発育の顕著な抑制が見られる点(Endpoint L)での判定を実施した。このような阻止帯の出現頻度は、CLDMで2%、TC、OFLXで10%、PC系3薬剤では24~46%、また、セフェム系3薬剤では32~44%であった。二重の阻止帯を示す株の感受性値としてEndpoint Hを採用した場合、被験株50株の感性率(NCCLSによる感受性側のBPに基づく)は、EMを除く9薬剤で、51~100%であった。耐性株は、TCとCLDMには全く認められなかった。その他の薬剤については、PC系3薬剤で22~49%、セフェム系3薬剤で18~26%、OFLXで20%に耐性株が認められ、ADT法による結果と異なる結果が得られた。

今回ADT法での結果で見ると、F. nucleatum の50株中に、 $\beta$ -ラクタム系の6薬剤に一樣に高度耐性を示す株が3株(6%)認められた。また、OFLXに耐性を示す株が2株(4%)認められた。しかし、CLDMとTCに対する耐性株は認められなかった。Etestは、F. nucleatum に対するパフォーマンスに問題がある現行の化学療法学会標準法である微量液体希釈法に代わる日常検査で実施可能な感受性試験検査の一つとして有用であると考えられ、その普及のため判定基準の統一が必要と考えられた。

## $\beta$ -lactam 薬加水分解酵素( $\beta$ -ラクタマーゼ)産生菌等の検出法の検討

北里大医微生物 井上松久

注射用や経口用 $\beta$ -ラクタム薬の使用量の増加と起因菌が類薬に曝される時間的要因の増加により、耐性菌が益々選択される。また、欧米に比べてマクロライド耐性 *Streptococcus pneumoniae* の分離率も高い。そこで、今年度は $\beta$ -ラクタム薬耐性の一つの要因である $\beta$ -ラクタマーゼの量的・質的変異菌の遺伝子変異とマクロライド耐性の遺伝子変異の確認法を中心に検討を加えた。

### 1. Class C 型酵素産生に関わる遺伝子変異の検出

グラム陰性桿菌に広く分布する Class C 型酵素の構造遺伝子 *ampC* は、調節遺伝子 *ampR*, *ampD* および *ampG* によって制御されている。*Escherichia coli* の *ampD*, *Enterobacter cloacae* の *ampD* および *ampG* 変異株を分離し、これら変異株の DNA 塩基配列を調べた。*ampD* はその変異部位によって 3 u/mg protein-40 u/mg 蛋白と酵素活性が著しく異なった。一方、*ampR* 変異によっても class C 型酵素の増加が見られるが、*ampR* 変異株の選択は *ampD* 変異を伴う株で著明であった。さらに、class C 型酵素多量変異株から *ampG* 変異株を分離した結果、その変異は、*ampG* プロモーター部位に終止コドンが見られ、機能しないことが判った。変異 *ampD* は、野生型 *ampD* に対して劣性、変異 *ampR* は野生型 *ampR* に対して優性であった。野生型 *ampD* や *ampR* をセフェム薬耐性菌に遺伝子導入することで、変異の確認が可能となる。また、変異 *ampG* 株に野生型 *ampG* を共存させると酵素産生の復帰が認められ、それに伴ってセフェム薬の MIC の上昇も見られた。以上の結果から、PCR による DNA 塩基配列による確認は勿論であるが、これら *ampD* 野生型遺伝子および変異型 *ampR* の高頻度共存系を確立することによりその確認の可能性が考えられる。

### 2. *ermAM* 遺伝子保有マクロライド耐性肺炎球菌における 16 員環マクロライド薬感受性株の PCR 法による検索

肺炎球菌におけるマクロライド(MLs)耐性機構は、主に *mefE* 蛋白による薬剤排出機構と *ermAM* 遺伝子にコードされるメチラーゼによる標的部位(23S rRNA)の修飾である。前者は 14、15 員環系薬にのみ耐性を示し、後者はこれらに加えてリンコサミド系薬にも耐性を示す。従って、両者はリンコサミド系薬にて容易に識別できる。また、それぞれの遺伝子の PCR 法による迅速検出法も確立されている。一方、16 員環系薬は、*mefE* 蛋白による薬剤排出機構の影響を受ず、さらに一部の *ermAM* 遺伝子保有株に対しても良好な抗菌力を有する。今回、*ermAM* 遺伝子とその発現に関わる調節領域を含め、それぞれ EM 耐性あるいは EM・RKM 耐性発現に対応する 2 種類のプライマーを作成し、PCR 法による *ermAM* 遺伝子保有株中の 16 員環系薬感受性株の迅速検出法を検討した。*ermAM* 遺伝子保有 22 株を用いて検討した結果、プライマー E1-e1 にて陽性の 11 株は全て RKM 感受性(MIC  $\leq$  1mg/mL)であり、プライマー R1-e1 にて陽性の 11 株は RKM に対して中等度から高度耐性を示した。また、両プライマーに陽性の株はなく、それぞれのプライマーは特異的であった。今後、さらに対象を増やすとともに、そのメカニズムについて検討予定である。

研究協力者：岡本了一、海江田 哲

## CefcapeneはクラスC $\beta$ -ラクタマーゼを不活化する

山口恵三、石井良和

東邦大学医学部微生物学教室

目的:クラスCに属する $\beta$ -ラクタマーゼはセファロスポリン系抗菌薬を効率良く分解することが知られている。1980年代以降に発売されたセフェム系抗菌薬は、クラスC  $\beta$ -ラクタマーゼに対して安定性であることから本酵素を産生する菌株に抗菌力を発揮する薬剤である。私たちは、酵素学的見地から、各種 $\beta$ -ラクタマーゼと各種 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬の反応様式を観察してきたが、その中でCefcapene (CFPN) が染色体性AmpCを失活させることが確認された。今回は、各種 $\beta$ -ラクタマーゼのCFPNに対する酵素学的解析を加えることを目的に検討を試みた。

材料および方法:クラスA  $\beta$ -ラクタマーゼとしてTEM-1、TEM-18、SHV-1、Toho-1、Toho-3、NMC-A、クラスD酵素としてOXA-1、OXA-10、クラスB酵素としてL-1、IMP-1、CphA、CcrA、クラスC酵素として*E. cloacae* 908、*E. coli* K12、*P. aeruginosa*、*C. freundii*が産生するAmpCの精製した標品を用い、CFPNおよびCefpodoxime (CPDX) を対象薬剤とした。 $\beta$ -ラクタマーゼ活性の測定はUV法で測定し、そのデータをLiege 大学理学部タンパク質工学研究センターにて開発されたソフトを用いて解析した。

結果および考察:CFPNおよびCPDXはTEM-1、TEM-18およびSHV-1に対する $K_m$ 値は0.5mMから27mMと極めて大きな値を示し、極めて低い親和性を有していることが明らかとなった。一方、Toho-1に対する $K_m$ 値は25から46  $\mu$ Mであり、TEM-型およびSHV-型 $\beta$ -ラクタマーゼと比較して高い親和性を有することが明らかとなった。クラスC  $\beta$ -ラクタマーゼに対するそれぞれのパラメータを見ても、CPDXの $K_m$ 値は0.09から2.7  $\mu$ M、 $k_{cat}$ は0.3から1.3  $s^{-1}$ であったが、CFPNに対して明らかなInactivationパターンを示した。すなわち $K_m$ および $k_{cat}$ 値を算出することができなかったが、Inactivationパターンを示す酵素と基質に特有のパラメータが算出された。それぞれの値は、 $k_{+3}$ が0.002から0.2  $s^{-1}$ 、 $k_{+2}/K$ が $8.7 \times 10^5$ から $7.0 \times 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$ であった。一方、現在までMOX-1のCFPNに対するパラメータは算出できないが、MOX-1は本化合物を分解することが判明している。したがって、染色体性およびプラスミド性クラスC  $\beta$ -ラクタマーゼの分類にCFPNが有用である可能性が示唆された。

## 各種グラム陰性桿菌においてメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)-ディスク拡散法によるスクリーニングで検出した多様なメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの分子解析

国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

柴田尚宏、土井洋平、荒川宜親

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ(metallo- $\beta$ -lactamase)は、その活性中心に亜鉛をもつ $\beta$ -ラクタマーゼで、各種のペニシリンや広域セファロスポリン系抗生物質を分解するだけでなく、クラバン酸、スルバクタムなどの $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤、さらに各種のセリン型 $\beta$ -ラクタマーゼに安定とされるカルバペネム系抗生物質をも分解する能力を有する一群の金属酵素である。この種の酵素を産生するグラム陰性桿菌のカルバペネム耐性株は、我が国における外科手術、臓器移植、免疫療法、癌治療などの高度医療の発展に伴い、術後感染症や院内感染症の起因菌として問題となりつつある。さらにそれらが高度耐性、多剤耐性を獲得した場合、MRSA や VRE と同様に臨床的に深刻な問題を提起すると考えられる。我々はこれまで、我が国において IMP-1 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを産生するグラム陰性桿菌が様々な感染症の症例などから分離されることを報告し警告してきた (The Lancet, 354, 955, 1999)、(Emerging infectious diseases, 6, 572-575, 2000)。しかし、IMP-1 型以外に各種のメタロ $\beta$ -ラクタマーゼを産生する株が近年多種類報告されつつある状況の中で、多様なメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を簡便に安価に検出する方法として、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考案し市販品として供給してきた。この試験法により、IMP-1 型だけでなく、他のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生も簡便にしかも安価に検出可能である事が特筆すべき点である。実際、近年 IMP-1 型以外のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼとして、IMP-2 型、VIM-1、VIM-2 型など海外で発見され、一部には outbreak の事例も報告されつつある。

我々は、本試験法によるスクリーニング検査により IMP-2 型、VIM-2 型のメタロ $\beta$ -ラクタマーゼ産生株の存在を国内ではじめて確認し報告した (N. Shibata, et al., ASM General Meeting, 2001)。今回、我々は、IMP-1 型に加え我が国で検出報告例のなかった IMP-1 型以外のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を検出し解析したので、その菌種と分布状況について報告する。

## バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) とバンコマイシン耐性拡散要因 及びバンコマイシン低感受性 MRSA

池 康嘉<sup>1,2</sup>、谷本弘一<sup>1</sup>、藤本修平<sup>1</sup>、富田治芳<sup>1</sup>、小澤良之<sup>1</sup>、野村隆浩<sup>1</sup>  
群馬大学医学部微生物学教室<sup>1</sup>、同 薬剤耐性菌実験施設<sup>2</sup>

日本はいわゆる先進工業国では唯一、VRE が医療環境及び自然環境に拡散していない極めて稀な国である。1997 年の最初の報告以来、現在まで高度バンコマイシン耐性腸球菌は約 30 例から分離されている。しかしながら、過去アボパルシン使用歴のある国からの輸入鶏肉から、高頻度に VRE が分離されることや、輸入鶏肉から分離される VRE と同じ遺伝子構造の VRE が健常者から分離されること、更に日本の *E. faecium* から高頻度接合伝達性耐性プラスミドが分離されること等から、VRE 拡散素地は存在していると考えられる。一方、日本は欧米に比較し、グリコペプチド系抗生物質の使用歴が短い (米国 30 年以上、日本は約 10 年) にもかかわらず、バンコマイシン低感受性 MRSA が存在するとの 1 例報告がある。

今回の患者由来の新たな型の VRE 解析、*E. faecium* に特異的に存在する高頻度接合伝達性プラスミド、及び全国の患者由来 MRSA のバンコマイシン感受性について報告する。

1. 患者下肢壊死褥創部から分離されたバンコマイシン耐性 *E. raffinosus* の、バンコマイシン、テイコプラニンの MIC はそれぞれ 256 µg/ml であった。VanA、vanB、vanC、vanD、及び vanE 検出用プライマーを用いた PCR では全て陰性であった。VanA 型 ligase の遺伝子の中で、VRE の ligase 遺伝子で保存されているシーケンスを用いたこの株の ligase 遺伝子の PCR 産物のシーケンスの結果、この VRE は VanD4 型とほぼ同一 (2 塩基の違い) であることが解った。このことは我が国においても各種の獲得耐性 VRE が存在することが考えられる。
2. アメリカ合衆国ミシガン大学附属病院で、1994 年から 1999 年の間に分離された 640 株の高度バンコマイシン耐性 VRE のうち、492 株 (77%) はゲンタマイシン MIC 64 µg/ml 以上のゲンタマイシン高度耐性菌であった。429 株の Gm<sup>r</sup> 株のうち、261 (53%) 株のゲンタマイシン耐性は液体培地中で高頻度に接合伝達した。高頻度接合伝達性 Gm<sup>r</sup> プラスミドは、その制限酵素断片のアガロースゲル型から A、B、C、D、E の 5 型に分類され、A、B 型がそれぞれ 40% と最も高頻度に分離された。ゲンタマイシン耐性プラスミド耐性は、共存するバンコマイシン耐性を高頻度 (90%以上) に可動化させることが解った。これらのゲンタマイシン耐性プラスミドは、先に日本の臨床分離 *E. faecium* から分離された高頻度接合伝達性ゲンタマイシン耐性プラスミド pMG1 (65.1 kb) と Southern hybridization で完全な相同性があった。このことは pMG1 型のプラスミドが *E. faecium* に特異的に存在し、各種の薬剤耐性菌を腸球菌間で拡散させる役割をしていることが考えられた。
3. 全国 278 病院 (500 bed 数以上) から、1997 年 11 月から 12 月の間に分離された MRSA 6,625 株について、バンコマイシン感受性を調べた結果、全株 0.25 µg/ml ~ 2 µg/ml (MIC) の範囲に存在した。その他 vancomycin intermediately resistant *S. aureus* (VISA) が高頻度に分離されるとされる vancomycin heterogeneously resistant MRSA (バンコマイシンヘテロ耐性 MRSA) も分離されなかった (J.Clin.Microb. 2001.39:4445-4451)。

**The clinical, environmental, and agricultural isolates in  
Korea in recent years.**

Professor Lee Yeonhee (李 蓮姬)

Culture Collection of Antibiotic Resistant Microbes

Division of Environmental and Biological Sciences

Seoul Women's University, KOREA

## Convenient Test for Screening Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds

YOSHICHIKA ARAKAWA,<sup>1\*</sup> NAOHIRO SHIBATA,<sup>1</sup> KEIGO SHIBAYAMA,<sup>1</sup> HIROSHI KUROKAWA,<sup>1</sup>  
TETSUYA YAGI,<sup>1</sup> HIROSHI FUJIWARA,<sup>1</sup> AND MASAFUMI GOTO<sup>2</sup>

*Department of Bacterial and Blood Products, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo,<sup>1</sup> and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto,<sup>2</sup> Japan*

Received 28 June 1999/Returned for modification 21 August 1999/Accepted 22 September 1999

A simple disk diffusion test was constructed for detection of IMP-1-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria. Two Kirby-Bauer disks containing ceftazidime (CAZ) and a filter disk containing a metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor were used in this test. Several IMP-1 inhibitors such as thiol compounds including 2-mercaptopropionic acid, heavy metal salts, and EDTA were evaluated for this test. Two CAZ disks were placed on a Mueller-Hinton agar plate on which a bacterial suspension was spread according to the method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards. The distance between the disks was kept to about 4 to 5 cm, and a filter disk containing a metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor was placed near one of the CAZ disks within a center-to-center distance of 1.0 to 2.5 cm. For IMP-1-producing strains, the growth-inhibitory zone between the two disks expanded, while no evident change in the shape of the growth-inhibitory zone was observed for CAZ-resistant strains producing serine  $\beta$ -lactamases such as AmpC or SHV-12. As a result, 2 to 3  $\mu$ l of undiluted 2-mercaptopropionic acid or mercaptoacetic acid able to block IMP-1 activity gave the most reproducible and clearest results, and CAZ-resistant strains producing AmpC or extended-spectrum  $\beta$ -lactamases were distinguishable from IMP-1 producers by this test. A similar observation was made with IMP-1-producing clinical isolates such as *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* spp., and *Alcaligenes xylosoxidans*. The specificity and sensitivity of this test were comparable to those of PCR analysis using *bla*<sub>IMP</sub>-specific primers. Therefore, this convenient test would be valuable for daily use in clinical laboratories.

Carbapenem-resistant gram-negative bacterial species such as *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* have emerged in Japan, and these isolates usually produce IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase (7, 9, 13, 15, 17). The *bla*<sub>IMP</sub> genes responsible for the IMP-1 production are usually mediated by integrons carried by transferable large plasmids (1). About 4.4% of *S. marcescens* strains and 1.3% of *P. aeruginosa* strains have already acquired IMP-1 productivity in Japan (manuscript in preparation), and transmissions of the *bla*<sub>IMP</sub> gene cassette have been observed among various gram-negative rods (18). Since IMP-1 producers tend to demonstrate a wide range of resistance to various broad-spectrum  $\beta$ -lactams including the oxyimino cephalosporins, cephamycins, and carbapenems, early recognition of IMP-1 producers is very important for rigorous infection control (3). The worldwide spread of this kind of organism is becoming a general concern, since several metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria have recently been reported outside Japan (5, 11, 19). Indeed, PCR analyses usually give reliable and satisfactory results (18), but this method is of limited practical use for daily application in clinical laboratories because of the cost. Thus, the development of a simple and inexpensive testing method for screening of IMP-1 producers has become necessary.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** Clinically isolated ceftazidime (CAZ)-resistant (MIC, >64  $\mu$ g/ml) gram-negative bacterial strains were used in the test. Several of these

isolates were later found to carry the *bla*<sub>IMP</sub> gene by PCR. A well-characterized extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) (SHV-12) producer and AmpC hyperproducers were also used as the control strains. A list of the bacterial strains tested in this study is shown in Table 1.

**Evaluation of metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors.** CuCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, EDTA, and thiol compounds including mercaptoacetic acid, 2-mercaptopropionic acid, and mercaptoethanol were used and evaluated for IMP-1 inhibition, because these agents

TABLE 1. Strains used in this study

Strain	$\beta$ -Lactamase produced	Source or reference
<i>Serratia marcescens</i> MKDM17	IMP-1	17
<i>Serratia marcescens</i> HKY414	AmpC (hyperproduction)	This study
<i>Klebsiella pneumoniae</i> MKD115	IMP-1	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i> HKY402	SHV-12	This study
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MKAM12	IMP-1	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pa9	AmpC (hyperproduction)	This study
<i>Pseudomonas putida</i> MSGD1	IMP-1	17
<i>Acinetobacter</i> sp.	IMP-1	This study
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> MNG10131	IMP-1	17
<i>Enterobacter cloacae</i>	IMP-1	This study
<i>Enterobacter aerogenes</i>	IMP-1	This study
<i>Citrobacter freundii</i>	IMP-1	This study
<i>Escherichia coli</i>	IMP-1	This study
<i>Proteus vulgaris</i>	IMP-1	This study

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Bacterial and Blood Products, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan. Phone: 81-42-561-0771, ext. 500. Fax: 81-42-561-7173. E-mail: yarakawa@nih.go.jp.

20010709

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。

### 「研究成果の刊行に関する一覧」

- 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  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother. 2000 44(3):561-7.