

型 *ampR* DNA 断片を共存させると class C 型酵素活性が著しく増えることから *ampR* 野生株に対して *ampR* 変異が優性であることも判明した。以上の実験結果から、*ampR-ampC* を保有する場合、*ampR* が変異すると AmpC は *ampD*, *ampG* いずれの野生株でも十分量産生し、セファロスポリン系薬高度耐性に大きく関与する可能性とその選択条件が示唆されたものと考える。

#### (4) *Enterobacter cloacae* 由来 class C 型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生に関与する調節遺伝子 *ampG* の解析

Class C 型  $\beta$ -ラクタマーゼ AmpC 産生の初期段階に関与する AmpG については、その機能が詳しく調べられていない。そこで、今回は *ampG* 及びその産物である AmpG について調べ、セフェム系薬の耐性発現の調節機構を分子メカニズムの観点から解析した。

*E. cloacae* の *ampG* 全領域を含むプラスミド pGKS171-3 についてプライマーウォーキングを行い、*ampG* の DNA シークエンスを決定した。また、このプライマーをもとに、臨床分離株 KU3 及び、そのセフェム系薬超感受性変異株 KU69、さらに復帰変異株 10 株について DNA シークエンスを行った。また、 $\beta$ -ラクタマーゼ及び AmpG に対するペプチド抗体を用いて各菌株をレーザー顕微鏡で観察し、さらに電子顕微鏡を用いて細菌内の AmpG 局在観察を行った。その結果、臨床分離株 KU3 (*E. cloacae*) を親株とし、セフェム系薬超感受性 KU69、及びその復帰変異株 60 株を選択し、これらの株の *ampG* の DNA シークエンスを行った。その結果、セファロスポリン系薬超感受性 KU69 の *ampG* は、親株 KU3 と比べ 132 番目のトリプトファン (TGG) が点変異によって終止コドン (TAG) となった。それに伴ない親株 KU3 の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性に比べ約 1/3000 に低下することが判った。即ち、AmpG の機能を傷害させることが、 $\beta$ -ラクタマーゼの耐性化を防ぐと一つの方法となり得る。

次に、 $\beta$ -ラクタマーゼ抗体及び AmpG 抗体を用いて、細胞内での  $\beta$ -ラクタマーゼの有無をレーザー顕微鏡で観察した結果、KU3 では class C 型  $\beta$ -ラクタマーゼの産生を認めたが、KU69 では  $\beta$ -ラクタマーゼとの反応は著しく抑制されるという結果を得た。AmpG 点変異株または欠損株では class C 型  $\beta$ -ラクタマーゼが産生されないことが判った。

一方、KU69 の復帰変異株 60 株から class C 型酵素活性の異なるものを任意に 10 株選択し、*ampG* の DNA シークエンスを行った結果、KU69 と比べ 132 番目の終止コドン (TAG) がチロシン (TAT) に変異したもの 3 株、グルタミン (CAG) に変異したもの 1 株、リジン (AAG) に変異したもの 1 株得られた。この中には、 $\beta$ -ラクタマーゼの酵素活性が親株 KU3 と同等に回復した変異株も認められた。このことから、132 番目以降のアミノ酸が AmpG 活性に影響を十分与え得るものと言える。今回の結果では、AmpG の量的変化が薬剤によって影響を受けるのか、あるいは今のところ、*ampG* の活性部位は不明であるが、この点については、近々詳しく調べる予定である。

## 多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* のカルバペネム系抗菌薬に対する耐性機構の解明

木村聡一郎、石井良和、門野愛美、後藤直正、西野武志、山口恵三

東邦大学医学部微生物学講座

京都薬科大学微生物学講座

【目的】多剤耐性 *Pseudomonas aeruginosa* は、カルバペネムを含む $\beta$ -ラクタム系薬、アミノ配糖体系薬およびキノロン系薬に対して耐性を示すことから、その治療は困難を極めることが多い。カルバペネム系薬耐性 *P. aeruginosa* というと、まず IMP-1 のようなクラス B 型 $\beta$ -ラクタメースの関与が考えられる。しかし、今回対象とした *P. aeruginosa* はクラス B 型酵素を産生しないことから、今回は *P. aeruginosa* のカルバペネム系薬に対するクラス B 型酵素以外の耐性因子を解明することを目的として検討を行った。

【方法】*P. aeruginosa*TUM1529 は、当大学付属病院に入院中の患者尿から分離され、市販されている全ての $\beta$ -ラクタム系薬およびキノロン系薬そして、多くのアミノ配糖体系薬に耐性を示した。本菌株の染色体上に存在する $\beta$ -ラクタメース(AmpC)は $\beta$ -ラクタム系薬存在下で大量に誘導された。そこで、既報にしたがい *ampC* を Knockout した *P. aeruginosa* TUM1529' を得て、その親株と $\beta$ -ラクタム系薬に対する感受性を比較することにより、AmpC のカルバペネム系薬耐性への関与について検討した。

【結果および考察】*P. aeruginosa* TUM1529 は、imipenem、meropenem および biapenem に対して各々32、16、32 $\mu$ g/ml の MIC 値を示したのに対して、Knockout 株である *P. aeruginosa* TUM1529' はいずれも 2 $\mu$ g/ml 以下の値を示した。さらに、*ampC* knockout 株で cefepime、ceftazidime など多くの $\beta$ -ラクタム系薬の MIC 値が感受性化した。以上の結果から、多剤耐性 *P. aeruginosa* のカルバペネム系薬耐性への AmpC の関与が示唆された。

## アルベカシン高度耐性緑膿菌の耐性機構の解析

国立感染症研究所 細菌第二部  
横山佳子、荒川宜親

現在までに報告されているアルベカシン(ABK)耐性菌の耐性機序については薬剤のアセチル化とリン酸化を同時に行う二機能酵素による報告がある。今回、ABK の最小発育阻止濃度(MIC)が1,000 µg/ml 以上を示す高度耐性緑膿菌(AR-2株)が臨床分離された。AR-2株は他のアミノグリコシド(AG)系抗生物質にも高度耐性を示し (Table 1)、新規の耐性機構を獲得している可能性が示唆されたため、その耐性メカニズムの解析を行った。

ABK 耐性遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。ABK 耐性遺伝子は 756 塩基、251 アミノ酸をコードしており、ホモロジー検索を行った結果、AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼ遺伝子に近縁のものであった。我々は ABK 耐性遺伝子を *magr A* (multiple aminoglycoside resistance gene A) と命名した。AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼは AG の標的部位である 30S リボソームにおける 16S rRNA の塩基をメチル化することにより AG の結合を妨げる作用をし、*Streptomyces* や *Micromonospora* などの AG 産生放線菌が自己防衛手段として生来獲得している酵素である。また特徴として転写後に rRNA を修飾することが挙げられ、リボソーム構成過程で関与する種々の RNA メチラーゼとは性質が異なる酵素である。数種の AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼおよび *MagrA* のアミノ酸配列をもとに作成したデンドログラムを Fig.1 に示した。さらに *MagrA* は ABK のみならず類似の基本構造を有するカナマイシン系、ゲンタマイシン系の抗生物質全てに高度耐性(MIC, >1,024 µg/ml)を付与した(Table 1)。また接合実験の結果、*magr A* 遺伝子は他の緑膿菌株に伝達されることから、プラスミド上に存在することが示唆された(Table 1)。さらにアイソトープ標識した S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とし、リボソームの 30S サブユニットを基質として酵素反応を行い、*MagrA* の 16S rRNA メチラーゼ活性を測定した。その結果、放射活性の取り込みが認められ、*MagrA* は 16S rRNA メチラーゼであることが強く示唆された(Fig.2)。

本研究において ABK 高度耐性緑膿菌より AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼ遺伝子と近縁の遺伝子が発見され、現在までに放線菌以外の細菌からこのような遺伝子が検出された報告例はなく、全く新しい AG 高度耐性メカニズムを獲得した緑膿菌が臨床現場に出現したことが世界で初めて確認された。

H12 年度報告内容：カルバペネム耐性緑膿菌から分離された VIM-2 型 MBL

H13 年度報告内容：カルバペネム耐性株から分離された IMP-2 型 MBL など

Table 1. AR-2、大腸菌クローンおよび接合体における各種AG系抗生物質のMIC値

	MIC (µg/ml)									
	KM系				GM系					
	KM	TOB	AMK	ABK	GM	SISO	ISP	NEO	SM	HYG-B
<i>P. aeruginosa</i> AR-2	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	128	1024
pBCH9/XL1-Blue	>1024	256	>1024	>1024	>1024	512	>1024	4	4	64
pBCH913/XL1-Blue	>1024	512	>1024	>1024	1024	>1024	>1024	2	2	32
pBC/XL1-Blue	2	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	4	4	32
XL1-Blue	2	1	4	0.5	0.5	0.5	0.25	4	4	32
AR-2/105 conjugant	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	1024
<i>P. aeruginosa</i> 105	>1024	256	4	4	>1024	>1024	8	>1024	>1024	512

pBCH9/XL1-Blue: 約7kbの断片を有するクローン pBCH913/XL1-Blue: 塩基配列決定に用いたクローン  
 KM: カナマイシン、TOB: トブラマイシン、AMK: アミカシン、ABK: アルベカシン GM: ゲンタマイシン、  
 SISO: シソマイシン、ISP: イセパマイシン、NEO: ネオマイシン SM: ストレプトマイシン、HYG-B: ハイグロマイシンB  
*P. aeruginosa* 105: recipient strain

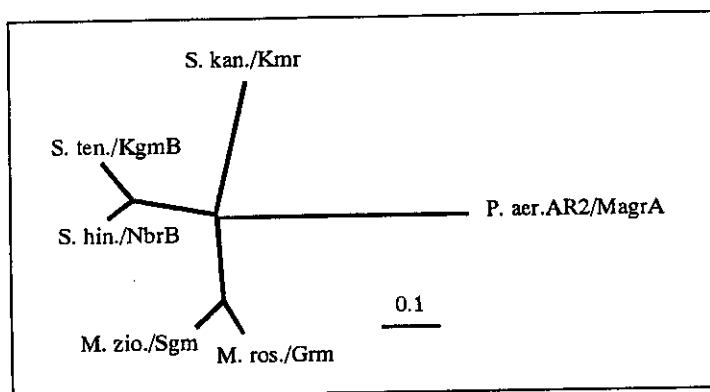
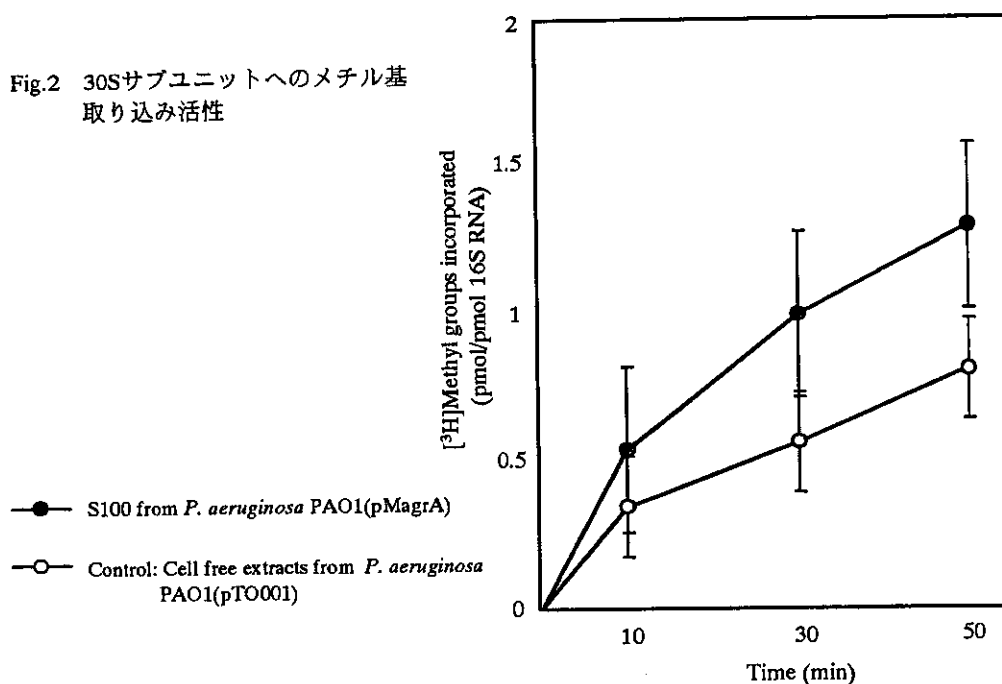


Fig.1 放線菌の16S rRNAメチラーゼおよびMagrAのアミノ酸配列をもとに作成したデンドログラム

Fig.2 30Sサブユニットへのメチル基取り込み活性



## 臨床分離フルオロキノロン高度耐性菌の耐性遺伝子の解析 およびキノロン感受性に影響を与える因子に関する研究

分担研究者:千葉大学大学院薬学研究院 山本 友子

フルオロキノロンは、臨床において最も繁用されている抗菌薬のひとつであるが、近年多くの菌種が耐性化の傾向にあり、又高度耐性菌の出現が危惧されているところである。昨年度我々が行った臨床分離株(グラム陽性菌 331 株、陰性菌 430 株)のフルオロキノロン耐性の調査結果は、*P. aeruginosa* (32%)、*S. aureus* (70 %)、*S. epidermidis* (45 %)、*E. faecalis* (31%) で耐性菌が増加していることを示していた。さらに *P. aeruginosa* は Levofloxacin (LVFX) に対する MIC 64  $\mu\text{g/ml}$ ~512  $\mu\text{g/ml}$  を示す高度耐性菌が全体の 73% を占めていたことから、かなりのスピードで高度耐性化していると考えられた。さらに *P. mirabilis* に MIC 1024  $\mu\text{g/ml}$  を示す超高度耐性菌が存在した。これら臨床分離株のキノロン高度耐性メカニズムを解明するために、薬剤の標的酵素である DNA gyrase および Topoisomerase IV の遺伝子の解析を行った。キノロン耐性の主なメカニズムとして、標的酵素の変異に加え、透過性の低下や薬剤排出の亢進等が報告されている。そこで *P. aeruginosa* 高度耐性菌に関しては、薬剤排出による耐性化の可能性を併せて検討した。

細菌の薬剤感受性に影響を与える因子を同定するため、抗菌剤に曝露された大腸菌のプロテオミクスを行い、フルオロキノロン感受性に影響を与える細菌蛋白因子を見いだした。

(1)フルオロキノロン高度耐性プロテウスの耐性遺伝子の解析:フルオロキノロンは尿路感染症において最も高頻度で使用されていることから、尿路より分離された多くの菌種で耐性菌が認められる。腸内細菌の種々の菌種において、GyrA および ParC の変異と耐性の関連が報告されてきた。しかしながら、尿路より比較的高頻度に分離される *P. mirabilis* に関しては本研究開始時において報告がなかったことから、昨年度の疫学調査で分離された *P. mirabilis* フルオロキノロン高度耐性株の DNA gyrase 遺伝子 *gyrA*, *gyrB* および Topoisomerase IV 遺伝子 *parC*, *parE* について解析を行った。その結果 LVFX に対する MIC が 2 $\mu\text{g/ml}$  以上を示すすべての耐性菌において、GyrA の変異 (Ser83Ile まれに Glu87Lys) と ParC の変異 (Ser80Arg or Ileu) が認められた。一方、MIC が 128-1024 $\mu\text{g/ml}$  を示す高度耐性菌においては、GyrA, ParC の変異に加えて GyrB の変異 (Ser462Tyr) が共通に認められたことから、他の近縁菌種と異なり *P. mirabilis* のフルオロキノロン高度耐性には GyrB の変異が寄与する可能性が示唆された。同様の結果が、2002 年 8 月に報告された (AAC 46:2582) ことから、*P. mirabilis* においてはフルオロキノロン高度耐性をもたらす *gyrB* の変異が比較的高い頻度で起こっていると考えられる。

(2)緑膿菌のフルオロキノロン高度耐性メカニズムの解析:LVFX に対する MIC が 8-512 $\mu\text{g/ml}$  の *P. aeruginosa* 34 株について、*gyrA*, *gyrB*, *parC* の QRDRs を解析した。すべての耐性菌において、GyrA の変異 (Thr83Ile まれに Asp87Asn) と ParC の変異 (主に Ser87Leu) が認められた。一方 *gyrB* 塩基配列には数多くの変異が認められたが、いずれもサイレント変異であった。*P. aeruginosa* の排出ポンプ非特異的阻害剤である  $\beta$ -Naphthylamine を用いて、排出亢進による耐性化の可能性を検討した結果、66.6% の分離株において阻害剤による LVFX 耐性低下が認められた。阻害剤の効果は MIC32 $\mu\text{g/ml}$  以上の耐性菌に集中して認められたが、一方では MIC128-512 $\mu\text{g/ml}$  の高度耐性菌の中に阻害剤の影響を全く受けない菌株も存在した。

(3)フルオロキノロン感受性に影響を与える因子に関する研究:昨年度は、LVFX に曝露された大腸菌のプロテオーム解析を行い、ストレス蛋白質が誘発される事を明らかにした。今年度はこの誘発のメカニズムを検討したところ、LVFX によりストレス応答の正の制御因子シグマ 32 が誘発される事、さらに細胞内に凝集蛋白が蓄積する事が明らかとなった。従って LVFX により細胞内に過剰に蓄積した凝集蛋白が DnaK シャペロンを消費することにより、DnaK によるシグマ 32 の活性抑制が解除されストレス応答が誘発されると考えられる。当研究室保存のストレス遺伝子変異株ライブラリーを用いて、キノロン感受性に影響を与える因子を検索した結果、Lon プロテアーゼの効果を見いだした。すなわち、Lon 欠損により大腸菌のキノロン感受性が顕著に増加する事、又この効果は GyrA, ParC 変異による耐性菌においても現れる事を明らかにした。感受性増加のメカニズムを検討したところ、感受性化は Lon 変異による細胞分裂の負の制御因子 SulA の蓄積とキノロンによる SOS 応答誘発を介した SulA の蓄積の相乗効果による事が明らかとなった。本結果は、Lon 活性阻害剤がフルオロキノロンの有効な併用剤となる可能性を示唆している。

## バンコマイシン耐性腸球菌のバンコマイシン耐性プラスミドの伝達性

主任研究者 池 康嘉<sup>1,2</sup>

研究協力者 富田治芳<sup>1</sup>、谷本弘一<sup>1</sup>、麻 興華<sup>1</sup>、藤本修平<sup>1</sup>、野村隆博<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>)

1. バンコマイシン耐性腸球菌(vancomycin resistant enterococci, VRE)の多く(90%)は *E. faecium* 菌で、多剤耐性である。VRE は 1988 年の報告以来、医療環境に予期せぬ速さで拡がり、大きな問題となっている。しかし、薬剤耐性が拡がるための細菌側の性質である、効率的な薬剤耐性遺伝子の伝達機構は *E. faecium* 菌及び VRE においてはこれまで解っていなかった。また腸球菌を含むグラム陽性菌において液体培地中での高頻度接合伝達性プラスミドの存在は一般的ではない。先に我々は日本の臨床分離高度ゲンタマイシン耐性 *E. faecium* 菌に液体培地中で高頻度に接合伝達するゲンタマイシン耐性プラスミド pMG1(65.1kbp)が存在することを世界で初めて明らかにし、同様のプラスミドが米国の VRE の約 50% に存在することを示した。今回、日本の一大学病院の患者、約 1700 人の便を調べた結果、10 人の患者から VRE (*E. faecium* 株、VanA type)が分離された。これらの VRE についてバンコマイシン耐性の伝達性を調べた。

10 人から分離された VRE 12 株は全てバンコマイシン耐性プラスミドを保持していた。これらは高頻度接合伝達性プラスミドで、液体培地中で接合伝達した。その伝達頻度は *E. faecium* 株へ供与菌当たり約  $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$ 、*E. faecalis* 株へ約  $10^{-6}$ ~ $10^{-7}$ であった。これらをプラスミドパターンから pHT $\alpha$  (65.9kbp)、pHT $\beta$  (63.7kbp)、pHT $\gamma$  (66.5kbp)の 3 種類に分類した。サザン解析の結果、これらは互いに高い相同性を示したが、これまで良く解析されている腸球菌の接合伝達性プラスミドとの相同性は無かった。しかし、プラスミド pMG1 と高い相同性を示し pMG1 プラスミドと同じ不和合性に属する、いわゆる pMG1-like プラスミドであった。またこれらは制限酵素地図から、これらのバンコマイシン耐性プラスミドは全て *Nde*I 断片 A~I から成り、その順は AIEBHDCGF であった。しかし、3 種類のプラスミドにおいて一部の断片の大きさが異なり、pHT $\beta$  がプロトタイプと考えられ、pHT $\alpha$  では 2.2kbp の DNA 領域が *Nde*I-A 断片内へ、pHT $\gamma$  では 2.8kbp の DNA 領域が *Nde*I-B 断片内へ挿入していた。またこれらは VanA 型トランスポゾン Tn1546 を有していた。PCR 解析から、これらのバンコマイシン耐性プラスミドは pMG1 で同定した伝達時の接合凝集形成に関与する *traA* 遺伝子を保持していた。バンコマイシン耐性プラスミドの *traA* の塩基配列は pMG1 及び米国から分離した 5 種類の pMG1-like ゲンタマイシン耐性プラスミドの塩基配列とは一部異なっていた。

これらの結果は pMG1 型プラスミド VRE を含め、*E. faecium* に一般的に分布し、腸球菌において薬剤耐性を拡散される重要な役割をしていることを示唆している。

2. 平成 14 年 3 月に全国 65 の医療施設から分離された MRSA1,400 株について、バンコマイシン感受性を NCCLS 法に基づき、寒天平板希釈法で調べた結果、すべての株がバンコマイシン MIC 0.5  $\mu$ g/ml ~ 2  $\mu$ g/ml であった。

20020616

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表」をご参照ください。

**「研究成果の刊行に関する一覧表」**

**Characterization of a novel plasmid-mediated cephalosporinase (CMY-9) and its genetic environment in an Escherichia coli clinical isolate.**

Doi Y, Shibata N, Shibayama K, Kamachi K, Kurokawa H, Yokoyama K, Yagi T, Arakawa Y.

Antimicrob Agents Chemother. 2002 Aug; 46(8): 2427-34.

**Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in Enterococcus faecium.**

Tomita H, Pierson C, Lim SK, Clewell DB, Ike Y.

J Clin Microbiol. 2002 Sep; 40(9): 3326-33.

**Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan.**

Ozawa Y, Tanimoto K, Nomura T, Yoshinaga M, Arakawa Y, Ike Y.

Appl Environ Microbiol. 2002 Dec; 68(12): 6457-61.

**Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem.**

Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M.

Antimicrob Agents Chemother. 2001 May; 45(5): 1343-8.

**An elegant means of self-protection in gram-negative bacteria by recognizing and extruding xenobiotics from the periplasmic space.**

Eda S, Maseda H, Nakae T.

J Biol Chem. 2003 Jan 24; 278(4): 2085-8. Epub 2002 Dec 01.

**A novel assembly process of the multicomponent xenobiotic efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*.**

Maseda H, Kitao M, Eda S, Yoshihara E, Nakae T.  
Mol Microbiol. 2002 Nov; 46(3): 677–86.

**Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*.**

Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inoue M, Konno M.  
Antimicrob Agents Chemother. 2001 Jun; 45(6): 1693–9.

**本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学解析 肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ**

生方公子, 小林玲子, 千葉菜穂子, 長谷川恵子, 紺野昌俊  
日本化学療法学会雑誌. 51 巻 2 号, Page60–70(2003.02)

**本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学解析 肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ(原著論文)**

生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 長谷川恵子, 紺野昌俊  
日本化学療法学会雑誌. 50 巻 11 号, Page794–804(2002.11)