

20030524

平成 15 年度
厚生労働科学研究費補助金
(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 (H15-新興-9)

研究報告書

平成16(2004)年 4月

主任研究者 池 康嘉

平成15年度 厚生労働科学研究費補助金（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	群馬大学大学院医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学、同 薬剤耐性菌実験施設	教授
分担研究者 (五十音順)	荒川 宜親	国立感染症研究所 細菌第二部	部長
	井上 松久	北里大学医学部 微生物・寄生虫学	教授
	生方 公子	北里大学 北里生命科学研究所 感染制御免疫部門 感染情報学研究室	教授
	後藤 正文	熊本大学 大学院医学薬学研究部 構造機能物理化学	教授
	後藤 直正	京都薬科大学 薬学部 微生物学	助教授
	堀田 國元	国立感染症研究所 生物活性物質部	室長
	山口 恵三	東邦大学 医学部 微生物学講座	教授
	山本 友子	千葉大学大学院 薬学研究院 微生物薬品化学研究室	教授
	渡辺 治雄	国立感染症研究所 細菌第一部	部長
研究協力者 (順不同)	谷本 弘一	群馬大学 薬剤耐性菌実験施設	
	藤本 修平	群馬大学大学院医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学	
	富田 治芳	同上	
	野村 隆浩	同上	
	井上 貴子	同上	
	石綿 司	同上	
	浦部 優子	同上	
	麻 興華	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	
	横山 佳子	国立感染症研究所 細菌第二部	
	土井 洋平	同上	
	山根 一和	同上	
	柴田 尚宏	同上	
	八木 哲也	同上	
	柴山 恵吾	同上	
	加藤 はる	同上	
	和知野 純一	同上	
	甲斐 久美子	同上	
	岡本 了一	北里大学 医学部 微生物・寄生虫学	
	中野 竜一	同上	

兼子 謙一	同上
小林 玲子	北里大学北里生命科学研究所 感染制御免疫部門 感染情報学研究室
諸角 美由紀	同上
長谷川 恵子	同上
千葉 菜穂子	同上
鈴木 悦子	同上
砂川 慶介	北里大学 医学部 感染症学講座
黒崎 博雅	熊本大学 大学院医学薬学研究部 構造機能物理化学
山口 佳宏	同上
村田 健	京都薬科大学 薬学部 微生物学
西野 武志	同上
石野 敬子	国立感染症研究所 生物活性物質部
石川 淳	同上
土崎 尚史	同上
木村 聡一郎	東邦大学 医学部 微生物学講座
石井 良和	同上
内村 眞佐子	千葉県衛生研究所
依田 清江	同上
泉谷 秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
廣瀬 健二	同上
和田 昭仁	同上

目 次

I. 総括研究報告

- 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 ----- 1
池 康嘉 (群馬大学大学院 医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学)

II. 分担研究報告

1. アルベカシン高度耐性グラム陰性桿菌の耐性機構の解析 ----- 18
荒川 宜親 (国立感染症研究所 細菌第二部)
2. 国内で分離されたメタロ- β -ラクタマーゼの遺伝型別 ----- 29
荒川 宜親 (国立感染症研究所 細菌第二部)
3. 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 ----- 40
池 康嘉 (群馬大学大学院 医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学)
4. 日本初のVRE院内感染症株から分離されたバンコマイシン耐性
プラスミドの解析 ----- 49
池 康嘉 (群馬大学大学院 医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学)
5. β -ラクタム系薬高度耐性化に関与する調節遺伝子の同定と診断法の研究 ----- 58
井上 松久 (北里大学医学部 微生物学)
6. 呼吸器感染症からの検査材料を用いた直接 PCR による原因菌の
迅速検索法の確立 ----- 66
生方 公子 (北里大学 北里生命科学研究所 感染制御免疫部門 感染情報学研究室)
7. カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究 ----- 76
後藤 正文 (熊本大学大学院 医学薬学研究部 構造機能物理化学分野)
8. 臨床分離緑膿菌の多剤耐性化に機能する排出システムの性状解析 ----- 94
後藤 直正 (京都薬科大学薬学部 微生物学教室)
9. 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 ----- 99
堀田 国元 (国立感染症研究所 生物活性物質部)

10. AmpC 大量産生株における ESBL の検出方法の確立 -----	106
山口 恵三 (東邦大学 医学部 微生物学講座)	
11. サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学 -----	111
山本 友子 (千葉大学大学院 薬学研究院 微生物薬品化学研究室)	
12. PCR-RFLP法を利用したニューキノロン低感受性 -----	116
チフス菌・パラチフスA菌の <i>gyrA</i> 変異のスクリーニング法の検討	
渡辺 治雄 (国立感染症研究所 細菌第一部)	

Ⅲ. 班会議抄録

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告書（平成15年度）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

15年度 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

（群馬大学大学院 医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学）

研究要旨 2001年1月より2002年12月に国内の医療施設で分離された、 β -ラクタム薬耐性株におけるメタロ- β -ラクタマーゼ (metallo- β -lactamase, MBL) MBLの産生状況やその遺伝子型別を調べた。調べた菌株は β -ラクタム剤耐性として分離されたグラム陰性菌978株である。978株の中で第3世代セフェムのセフトジジムとスルペラゾンに高度耐性の578株について解析を行った。メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) による阻害試験 (MBL簡便検出方法) の結果、587株431株が陽性であった。431株について、各種MBLに特異的なプライマーを用いてMBL型を検査した結果、431株すべてについてMBL遺伝子が検出できた。MBLの産生性を獲得した菌種としては、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)、*Pseudomonas ptida/fluorescens* などが多く、その他、*Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia* などのブドウ糖非発酵菌でMBL産生菌が多い傾向が見られた。【荒川】

従来報告されているアミノグリコシド (AG) 修飾酵素では不活化されにくいといわれていたアルベカシン (ABK) に対して高度の耐性を有する緑膿菌およびセラチアが分離された。ABK耐性に関与する遺伝子をクローニングし解析を行った。その結果、カナマイシンやゲンタマイシンなどのAGを産生する放線菌が、自己の16S rRNAをメチル化して保護するために産生する16S rRNAメチラーゼ遺伝子に類似した遺伝子を保持していることが判明した (緑膿菌の耐性遺伝子を *rmtA*、セラチア菌の耐性遺伝子を *rmtB* と名づけた)。また接合実験の結果、緑膿菌から分離された *rmtA* は他の緑膿菌株に伝達されること、また、セラチア菌の *rmtB* は接合伝達はしないが、プラスミドDNA

により大腸菌が形質転換されることから、いずれもプラスミド性の耐性遺伝子であった。RmtA、RmtB 耐性蛋白は 16S rRNA メチラーゼであった。*rmtA* 遺伝子は水銀耐性遺伝子を保持するトランスポゾン (Tn5041) 内に存在し、*rmtB* は Tn3 の下流に位置存在していた。[荒川]

VanD 型はこれまで世界で数例の報告のみである。日本で臨床分離された *E. raffinosus* VanD VRE の抗菌薬 MIC は、VCM (1,024 µg/ml)、TEIC (256 µg/ml)、GM (2,048 µg/ml)、EM (2,048 µg/ml)、ABPC (32 µg/ml) と、高度多剤耐性であった。D-Ala, D-Lac ligase 遺伝子の PCR 産物の塩基配列から、この株の ligase 遺伝子は VanD 型 VRE の VanD1, D2, D3, D4 の中で VanD4 型に相同性が高かった。既に報告されている VanD4 型の ligase 遺伝子の違いは、1,032 塩基中、2 ヶ所の塩基が異なっていた。また、タンパクのアミノ酸は 1 ヶ所が異なっていた。VanD4 遺伝子は染色体性で、遺伝子発現は恒常的に発現されていた。[池]

1 病院において分離された。19 株の *E. faecalis* VanB 型 VRE の VCM 耐性は、*E. faecalis* 受容菌に液体培地中で高頻度で接合伝達された。代表菌株より得られた接合伝達性プラスミド pUI22 は、117 kbp の *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミドであった。pUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされていた。[池]

呼吸器感染症における原因微生物の網羅的検索を目的として、原因菌となる確率の高い 6 種の微生物に対する PCR 法での同時・迅速診断法の確立をめざした。目的菌は、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③A 群溶血レンサ球菌、④マイコプラズマ菌 (*M.pneumoniae*)、⑤レジオネラ菌 (*L.pneumophila*)、⑥クラミジア菌 (*C.pneumoniae*) である。新たな方法での結果を得るまでの所要時間は、2~2.5 時間に短縮できた。[生方]

メタロ・β-ラクタマーゼ生産菌を迅速検出するために、メタロ・β-ラクタマーゼに特異的に結合する蛍光色素を用いる方法の開発研究を行った。メタロ・β-ラクタマーゼの活性中心に存在する Zn イオンと特異的に結合するチオール基と蛍光色素を含む DansylCnSH (n = 2-6) を化学合成した。この化合物は、メタロ・β-ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的に結合し、タンパク質側鎖と相互作用により蛍光が増大することが解った。[後藤正文]

臨床分離緑膿菌において、これらの排出機構による耐性を検出する方法を開発する目的で、キノロン耐性およびアミノ糖耐性緑膿菌において、排出機構の抗菌薬排出蛋白である *mexB*, *mexY* 遺伝子発現とそれぞれの蛋白を定量した。RT-PCR により mRNA を、ノーザンブロットにより蛋白を定量した結果、相互にほぼ相関関係があった。[後藤直正]

MRSA の各種の AG 不活化酵素遺伝子をコロニーから直接検出する迅速簡便検出法 (Multiple Colony Direct PCR) を開発した。今回この方法の有用性を調べた。臨床分離 MRSA の MIC 検査で、ゲンタマイシン (GM) 耐性およびアルベカシン (ABK) 耐性として分離された菌について、迅速簡便検出法で不活化遺伝子検査した結果、MIC 値の再検査でも耐性菌とされたものはすべて遺伝子も検出できた。[堀田]

第3世代セフェムを分解する菌が AmpC 型 β -ラクタマーゼ多量生産によるものか、ESBL 生産によるものかを鑑別する方法の開発を目的として研究を行った。第3世代セフェムのセフェムに対する感受性 (または耐性) は AmpC 型 β -ラクタマーゼ生産株と ESBL では異なる。この現象を利用し、寒天平板上での3次元拡散法を用いて、それぞれの生産株を鑑別する方法を開発中である。[山口]

非チフス性サルモネラ菌の多剤耐性機構の研究を行った。染色体性の一群の5剤耐性 (Ampicillin (Ap), Streptomycin (Sm), Sulfonamide (Su), Chloramphenicol (Cm), Tetracycline (Tc) 耐性) を持つ *Salmonella typhimurium* (ST) DT104 の急増が問題となっている。1999年から2000年に千葉県で食中毒患者から分離された ST 37 株の薬剤耐性遺伝子の構造解析を行った。37株中23株 (62%) に、ST の DT104 に存在する5剤耐性を保持していた。[山本]

ニューキノロン低感受性腸チフス菌・パラチフス A 菌の迅速検出方法の研究。ニューキノロン低感受性菌はジャイレース遺伝子の変異によりジャイレースタンパク (GyrA) の 83 番目または 87 番目のアミノ酸の点突然変異が存在する。これらの変異を PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 法によりスクリーニングする方法を開発した。これは、PCR 法により *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅し *HinFI* で切断しポリアクリルアミド電気

泳動で切断パターンを比較する方法である。[渡辺]

分担研究者（五十音順）

荒川 宜親 国立感染症研究所 部長
池 康嘉 群馬大学大学院 教授
井上 松久 北里大学医学部 教授
生方 公子 北里大学北里生命科学研究
所 教授
後藤 正文 熊本大学大学院 教授
後藤 直正 京都薬科大学薬学部 助教
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 千葉大学大学院薬学研究院
教授
渡辺 治雄 国立感染症研究所 部長

A. 研究目的

薬剤耐性菌による病院内感染症は、日本を含む先進国において共通の深刻で最も多い細菌感染症で、医療の安全を脅かし、高度先進医療の実施と発展に大きな障害となり、医療経済的にもさらなる負担を強いる。この背景には病院の入院患者において、高度先進医療の発展に伴い、より重度の免疫不全状態の易感染患者の増加、および人口の高齢化による易感染高齢者の増加と、各種抗生物質の多用により、有効な治療薬が存在しないまでに複雑化した、多剤薬剤耐性菌の医療現場への蔓延がある。人々の国際交流の活発

化、および耐性菌に汚染された食肉等の国際的流通の活発化に伴い、薬剤耐性菌は国際的にも伝播拡大する。薬剤耐性菌の拡散と病院内感染症の制御は、一病棟、一病院、一国家では制御しきれない状態になっており、国家をあげて取り組むべき問題とされている。薬剤耐性菌制御のための対策は、1) 薬剤耐性菌感染症の調査、2) 薬剤耐性菌の研究、3) 新薬の開発、が不可欠な対策として含まれる。我が国において厚生労働省の事業として薬剤耐性菌感染症の調査に対応するものとして、「薬剤耐性菌感染症サーベイランス事業」が平成12年度から開始された。そして「薬剤耐性菌の研究」に対応するものとして本研究課題の研究が平成12年度より新規に開始された。過去3年間の研究において、新たな各種の薬剤耐性菌や、薬剤耐性菌の拡散に関与する新たな接合伝達性プラスミド等も発見されその検出方法の研究と開発を行い、さらに各種の問題となる薬剤耐性菌の現状に関する全国的な調査研究を行い、それらの個々の調査結果を厚生労働省に報告してきた。本研究は、常に変化し発展する医療環境と社会環境に応じて、動的に複雑に変化する多剤薬剤耐性菌制御対策のための研究を、さらに発展させることを目的とするものである。また、厚生労働科

学研究の調査研究「薬剤耐性菌の発生動向のネットワークに関する研究」（荒川宜親班）と連動し、お互い補強し合う形で遂行する。

本研究では、一般の細菌検査室で分離や判定された耐性菌の中から、再試験や、詳しい分析が必要と思われる耐性菌を収集し、最新の検査・解析技術を用いて解析を行う事により、耐性菌の判定の精度を向上させることを目的とする。また、その結果を検査室に還元することにより、検査室の検査レベルの向上を促すことが期待できる。一方、新たに出現する耐性菌についての分子・遺伝子レベルでの解析を実施することで、それらを検出したリ識別する新しい検査・検出法の開発の研究を行う。必要に応じて問題となる薬剤耐性菌の全国的な疫学調査を行い、それらの耐性菌防御の基礎データを得る。これらの研究は、薬剤耐性菌の防御対策及びサーベイランス事業の精度を保証する上で不可欠である。

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。
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。
3. 遺伝子塩基配列の決定。

4. 薬剤耐性遺伝子のクローニングと遺伝子構造解析。
5. 遺伝学的変異株の分離と遺伝子発現機構の解析。
6. 免疫化学的方法を用いて、耐性発現蛋白の機能を解析。

C. 研究結果

荒川 宜親：国内で分離されたメタロ- β -ラクタマーゼの遺伝型別

近年、カルバペネム耐性を獲得したセラチアや緑膿菌の臨床分離株の増加が問題となっている。特に、カルバペネム高度耐性を獲得した株としては、メタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) と呼ばれる特殊な金属酵素を産生する株が、各地の医療施設から分離され問題となっている。そこで、2001 年 1 月より 2002 年 12 月に国内の医療施設で分離された、広域 β -ラクタム薬耐性株における MBL の産生状況やその遺伝子型別を調べた。調べた菌株は β -ラクタム剤耐性として分離されたグラム陰性菌 978 株である。978 株の中で第 3 世代セフェムのセフトジジムとスルペラゾンに高度耐性の 578 株について解析を行った。メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) による阻害試験 (MBL 簡便検出方法) の結果、587 株中 431 株 (73%) が陽性であった。431 株について、各種 MBL に特異的なプライマーを用いて MBL 型を検査した結果、431 株すべてに

ついて MBL 遺伝子が検出できた。

MBL の産生性を獲得した菌種としては、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)、*Pseudomonas ptida/fluorescens* などが多く、その他、*Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia* などのブドウ糖非発酵菌で MBL 産生菌が多い傾向が見られた。一方、腸内細菌では、*Serratia marcescens*, *Klensilla pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* などで、MBL 産生株が確認された。MBL の遺伝子型としては、IMP-1 型が最も多かったが、欧州で多く報告されている VIM-2 型 MBL 産生株も各地から分離される傾向が見られた。また、少数ではあるが IMP-2 型 MBL 産生株も確認された。

荒川 宜親：アルベカシン高度耐性グラム陰性桿菌の耐性機構の解析

従来報告されているアミノグリコシド (AG) 修飾酵素では不活化されにくいといわれていたアルベカシン (ABK) に対して高度の耐性を有する緑膿菌およびセラチアが分離された。ABK 耐性に関与する遺伝子をクローニングし解析を行った。その結果、カナマイシンやゲンタマイシンなどの AG を産生する放線菌が、自己の 16S rRNA をメチル化して保護するために産生する 16S rRNA メチラーゼ遺伝子に類似した遺伝子を保持していることが判明した (緑膿菌の耐性遺伝子を *rmtA*、

セラチア菌の耐性遺伝子を *rmtB* と名づけた)。また接合実験の結果、緑膿菌から分離された *rmtA* 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。セラチアから分離された *rmtB* は接合実験で伝達性は確認されないものの、プラスミドを抽出しエレクトロポレーション法で大腸菌に伝達させることが可能であったことから、この遺伝子もプラスミド上にあることが判明した。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て酵素反応を行い、RmtA および RmtB 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、RmtA および RmtB は 16S rRNA メチラーゼであることが確認された。

本耐性遺伝子の由来を調べるためそれぞれの酵素遺伝子の周辺の遺伝子構造を調べたところ、*rmtA* とその周辺構造は水銀耐性遺伝子を保持するトランスポゾン (Tn5041) 内に挿入される形で存在した。また *rmtB* は Tn3 の下流に位置することがわかっており、いずれの遺伝子も外来性に病原細菌に取り込まれた可能性が強いことが判明した。

池 康嘉：日本で初めて分離された VanD 型 VRE の解析

バンコマイシン耐性腸球菌

(vancomycin resistant enterococci, VRE) は vancomycin (VCM) および teicoplanin (TEIC) の耐性値、または VCM 耐性遺伝子構造の違いにより、これまで 6 種類が報告されている。それらは獲得耐性 VRE の VanA、VanB、VanD、VanG、VanE 型、自然耐性の VanC 型 (C1, C2, C3) である。臨床上問題となるのは、VanA、VanB、VanD 型で、これらは D-Ala⁴, D-Lac⁵ ligase 遺伝子をコードし、他の型は D-Ala⁴, D-Ser ligase 遺伝子をコードする。VanA、VanB、VanD 型の中で VanA および VanB 型 VRE は一般的に分離されるが、VanD 型はこれまで世界で数例の報告のみである。日本で臨床分離された *E. raffinosus* VanD VRE の抗菌薬 MIC は、VCM (1,024 µg/ml)、TEIC (256 µg/ml)、GM (2,048 µg/ml)、EM (2,048 µg/ml)、ABPC (32 µg/ml) と、高度多剤耐性であった。ligase 遺伝子の PCR 産物の塩基配列から、この株の ligase 遺伝子は VanD 型 VRE の VanD1, D2, D3, D4 の中で VanD4 型に相同性が高かった。既に報告されている VanD4 型の ligase 遺伝子の違いは、1,032 塩基中、2ヶ所の塩基が異なっていた。また、タンパクのアミノ酸は 1ヶ所が異なっていた。VanD4 遺伝子は染色体性で、遺伝子発現は恒常的に発現されていた。

池 康嘉：日本初の VRE 院内感染症株

から分離されたバンコマイシン耐性プラスミドの解析

1999 年 7 月、日本で初めて VanB 型のバンコマイシン耐性腸球菌 (VanB VRE) が 1 病院において分離された。このとき分離された 19 株の *E. faecalis* VanB 型 VRE の Van 遺伝子の接合伝達実験を行った。代表菌株より得られた接合伝達性プラスミド pUI22 は 117 kbp で、pUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされていた。このプラスミドは、*E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミドであった。VanB 遺伝子がフェロモン反応性プラスミド上にコードされ、急速な拡散がおきる可能性が示唆される。

井上 松久：β-ラクタム系薬高度耐性化に関与する調節遺伝子の同定と診断法の研究

グラム陰性菌の染色体上に一般的に存在する β-lactamase 生産遺伝子 AmpC 遺伝子の変異株を分離し、その調節遺伝子の変異により β-lactamase 生産量が上昇することが解った。

生方 公子：呼吸器感染症からの検査材料を用いた直接 PCR による原因菌の迅速検索法の確立

呼吸器感染症における原因微生物の網羅的検索を目的として、原因菌となる確率の高い 6 種の微生物に対する PCR 法での同時・迅速診断法の確立をめざした。

目的菌は、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③A 群溶血レンサ球菌、④マイコプラズマ菌 (*M.pneumoniae*)、⑤レジオネラ菌 (*L.pneumophila*)、⑥クラミジア菌 (*C.pneumoniae*) である。PCR のプライマーは、それぞれの菌の 16S rRNA 遺伝子の、菌種に特異的な塩基配列を基に設計した。新たな方法での結果を得るまでの所要時間は、2~2.5 時間に短縮できた。この方法を小児・呼吸器感染症の検査材料を用いて実施し、培養よりも高い精度であることを証明した。

後藤 正文：カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究

メタロ・β-ラクタマーゼ生産菌は、カルバペネムを含むすべての β-ラクタム剤に耐性となるために問題となる。メタロ・β-ラクタマーゼ生産菌を迅速検出するために、メタロ・β-ラクタマーゼに特異的に結合する蛍光色素を用いる方法の開発を行った。メタロ・β-ラクタマーゼの活性中心に存在する Zn イオンと特異的に結合するチオール基と蛍光色素を含む DansylCnSH (n = 2-6) を化学合成した。この化合物は、メタロ・β-ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的に結合し、蛋白質側鎖と相互作用により蛍光が増大することが解った。

後藤 直正：臨床分離緑膿菌の多剤耐性に機能する排出システムの性状解析

緑膿菌の多剤排出システムが関与する抗菌薬耐性発現には、キノロン薬耐性には MexAB-OprM と Mex XY-OprM が、アミノ配糖体耐性には Mex XY-OprM 機構が重要な役割をしていることが解った。臨床分離緑膿菌において、これらの排出機構による耐性を検出する方法を開発する目的で、キノロン耐性およびアミノ糖耐性緑膿菌において、排出機構の抗菌薬排出蛋白である *mexB*, *mexY* 遺伝子発現とそれぞれの蛋白を定量した。RT-PCR により mRNA を、ノーザンプロットにより蛋白を定量した結果、相互にほぼ相関関係があった。

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

MRSA におけるアミノグリコシド (AG) 耐性菌の迅速検出方法の開発を行った。AG 不活化酵素による AG 耐性は、各種の AG 不活化酵素により、それぞれの AG 薬剤に対して耐性となる。各種の AG 不活化酵素遺伝子をコロニーから直接検出する迅速簡便検出法 (Multiple Colony Direct PCR) を開発した。今回この方法の有用性を調べた。臨床分離 MRSA の MIC 検査で、ゲンタマイシン (GM) 耐性およびアルベカシン (ABK) 耐性として分離された菌について、再検査した結果、MIC も感受性で、迅速簡便検出法で

不活化酵素遺伝子も含まれていないものが約 30%含まれていた。また、再検査で MIC 値で耐性菌とされたものはすべて不活化遺伝子も検出できた。

山口 恵三: AmpC 大量産生株における ESBL の検出方法の確立

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-spectrum beta-lactamase, ESBL) は、元型の β -ラクタマーゼに安定な第 3 世代セフェム系抗菌薬をも分解する。AmpC 型 β -ラクタマーゼは元来、第 3 世代セフェムは分解しないが、多量生産株は第 3 セフェムを分解する。第 3 世代セフェムを分解する菌が、AmpC 型 β -ラクタマーゼの多量生産によるものか、ESBL 生産によるかを鑑別する方法の開発を目的として研究を行った。第 3 世代セフェムのセフェピムに対する感受性 (または耐性) は AmpC 型 β -ラクタマーゼ生産株と ESBL では異なる。この現象を利用し、寒天平板上での 3 次元拡散法を用いて、それぞれの生産株を鑑別する方法を開発するための実験を行った。AmpC 型 β -ラクタマーゼ多量生産菌はセフェピムを分解する効率が悪いことから、阻止円の縮小が認められなかった。一方、ESBL はセフェピムの分解効率がよいことから、阻止円の顕著な縮小を認めた。

山本 友子: サルモネラの多剤耐性菌の

レファレンスと分子疫学

非チフス性サルモネラ菌の多剤耐性機構の研究を行った。非チフス性サルモネラ菌は、食中毒の主要原因菌である。分離頻度の高い菌種は *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) および *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST) である。特に多剤耐性 ST の中で definitive type 104 (DT104) が急増し問題となっている。DT104 は染色体性の一群の 5 剤耐性 (Ampicillin (Ap), Streptomycin (Sm), Sulfonamide (Su), Chloramphenicol (Cm), Tetracycline (Tc) 耐性) を持つ。1999 年から 2000 年に千葉県で食中毒患者から分離された ST 37 株の薬剤耐性遺伝子の構造解析を、PCR を用いることにより行った。37 株中 23 株 (62%) に、ST の DT104 株に存在する 5 剤耐性を保持していた。これらの株の耐性領域の遺伝子構造解析、 β -ラクタマーゼ型別解析を行った。

渡辺 治雄: PCR-RFLP 法を利用したニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌の *gyrA* 変異のスクリーニング法の検討

ニューキノロン低感受性腸チフス菌・パラチフス A 菌の迅速検出方法の研究。腸チフス菌、パラチフス菌によるチフス症治療には、ニューキノロン系 (レボフロキサシン LUFX、スパフロキサシン

SPFX、トスキサシン TFLX) 抗菌剤が第一選択薬である。ニューキノロン低感受性菌によるチフス症は、ニューキノロンによる治療に抵抗性を示す。ニューキノロン低感受性菌はジャイレース遺伝子の変異によりジャイレース蛋白 (GyrA) の 83 番目または 87 番目のアミノ酸の点突然変異が存在する。これらの遺伝子の変異を PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 法によりスクリーニングする方法を開発した。これは、PCR 法により *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅し *HinfI* で切断しポリアクリルアミド電気泳動で切断パターンを比較する方法である。

D. 考察

グラム陰性菌の不活化酵素 (β -ラクタマーゼ) による β -ラクタム剤多剤耐性は、元型の β -ラクタマーゼ (セリン- β -ラクタマーゼ) の変異と進化により多剤耐性化した基質拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended Spectrum β -lactamase, ESBL) と、 β -ラクタマーゼの活性中心に金属イオンの Zn が存在するメタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) がある。基質拡張型 β -ラクタマーゼは広域活性を持つ第 3 世代セフェムは元型の β -ラクタマーゼには安定であるが、ESBL は 3 世代セフェムも分解する。また、メタロ- β -ラクタマーゼは、カルバベネムおよびセフェ

ムを含むすべての β -ラクタム剤を分解する。そのため、これらの β -ラクタマーゼ生産菌は、その感染症治療を困難にするために問題となる。これらの β -ラクタマーゼ生産菌のレファランスと迅速検出方法の開発を目的に研究推進された、これまでの研究で開発したメルカプト酢酸ナトリウム (SMA) による阻害試験 (MBL 簡便検出方法) を用いて検査した結果、国内分離広域 β -ラクタム剤耐性菌の 587 株中 431 株 (73%) は、MBL 剤耐性菌と判定され、MBL 特異的プライマーを用いて検査した結果も、431 株はすべて MBL 生産菌であることが確認された。このことは、MBL 簡便検出方法が有効であること、また、国内に MBL 生産菌が急速に拡散していることを明らかにしたものである [荒川 宜親]。

MBL 簡便検出方法開発のため、MBL に特異的に結合する物質と蛍光色素との化合物を新たに合成し、MBL に結合した化合物を蛍光色素により検出する方法を開発中である。これは MBL と特異的に化学結合する物質を利用した方法である。この研究は、MBL にのみならず、他の薬剤耐性に特異的な酵素の検出方法の開発にも応用することが可能なことが期待できる [後藤 正文]。MBL 生産菌と ESBL 多量生産菌による、カルバベネム不活化を鑑別する簡便検出方法の研究も実用化

の方向が示された [山口 恵三]。

AmpC 型 β -lactam 剤高度耐性化の遺伝子解析を行い、高度耐性化により AmpC 型 β -lactamase による β -lactam 剤基質拡張機構の解析に役立った [井上 松久]。

非チフスサルモネラ菌 (食中毒菌) の薬剤耐性菌の、薬剤耐性の現状と検出方法の開発のために日本で分離された菌についての基礎的な研究がなされた。この結果、この菌において、世界的に問題となっている *Salmonella typhimurium* DT104 型耐性菌が多く (68%) 分離されることが解った。この結果は、今後継続的な調査研究が必要と考えられる [山本 友子]。

いわゆるチフス菌の薬剤耐性では、その治療の第一選択薬であるキノロン耐性菌の検出方法の開発研究がなされた。この方法は、現在までに分離されているチフス菌のキノロン耐性菌が、ジャイレース遺伝子の特異的な部位の点突然変異であることを利用し、PCR-RFLP 方法により検出する方法である [渡辺 治雄]。薬剤の排出機構による薬剤耐性は、緑膿菌のキノロン耐性やアミノ糖の耐性で問題となる。これまでの排出機構の基礎的な研究に基づき、臨床分離株における排出機構による耐性菌の、検出方法の開発のための研究が行われた。この方法は PCR

を用いた排出蛋白遺伝子と、ノーザンブロットを用いた排出蛋白の検出を行い、その相関を研究したものである。今後、PCR 方法を用いることの有用性等に発展可能と考えられる [後藤 直正]。

呼吸器感染症には、各種の起因菌が関連する。これらの起因菌の中で主要な 6 種類の細菌に特異的な PCR プライマーを設定し、これらの細菌を、PCR 方法を用いて迅速検出する方法の開発研究が行われた。その結果、短時間で検出することが可能となった [生方 公子]。

MRSA の各種アミノグリコシド不活化による耐性をコロニーから PCR 方法を用いて検出する方法を臨床分離菌に応用した研究により、この検出方法の有用性が証明された [堀田 国元]。

アミノ糖系抗生物質のアルベカシン (ABK) は、これまで発見されているアミノ糖不活化酵素では分解されにくい薬剤である。この薬剤の高度耐性緑膿菌とセラチア菌の遺伝学的・生化学的研究を行い、これまでに発見されていない新たなアミノ糖不活化酵素を発見した。この酵素は、ほぼすべてのアミノ類を分解する酵素で、しかもプラスミド上に生産遺伝子が存在するために急速な拡散が危惧される。今後の継続的な調査研究が必要と考えられる。この薬剤耐性遺伝子は、アミノ糖抗生物質生産菌が保持している。

自らの抗生物質に対する耐性機構（遺伝子）から進化したものと考えられ、薬剤耐性の起源と進化という点から、細菌生物学的にも重要な発見である [荒川 宜親]。

バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）において、世界的にも報告例が少ない VanD 型 VRE が日本で新たに発見された [池 康嘉]。過去に日本の 1 病院での VRE 集団発生例起因菌が VCM 耐性遺伝子（VanB 遺伝子）が *E. faecalis* のフェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド上に存在していることにより、プラスミド性のバンコマイシン耐性が院内感染の急速な拡散の原因となり得ることが示された [池 康嘉]。Vancomycin 耐性 *E. faecium* (VanA VRE) より、世界で初めてバンコマイシン耐性高頻度接合伝達性プラスミドが分離され、このプラスミド VRE において VCM 耐性のみならず、各種の薬剤耐性を拡散させるプラスミドであることが解った [池 康嘉]。

F. 結論

(1) これまでに報告のない、新たな細菌学および厚生労働行政上重要な発見がいくつか成された。

グラム陰性菌の緑膿菌、およびセラチア菌の高度アミノ配糖体耐性菌から、临床上に用いられるほぼすべてのアミノ糖体抗生物を不活化し、耐性を賦与するア

ミノ配糖体不活化酵素とその遺伝子が発見された。これはこれまでに報告されていない、まったく新しい新型のアミノ配糖体耐性遺伝子である。接合伝達性プラスミド上に耐性遺伝子が存在するため、今後グラム陰性菌全体に拡散することも示唆される。そしてこの発見は、細菌学的・生物学的および医療上、また厚生労働行政上も重要な発見である [荒川 宜親]。

バンコマイシン耐性腸球菌は（VRE）は、腸球菌の中で主として *E. faecium* において分離頻度が高い。*E. faecium* 菌においては VRE のバンコマイシン耐性遺伝子の研究報告は多く存在するが、耐性遺伝子を拡散する高頻度接合伝達性プラスミド等は解っていなかった。VanA 型 *E. faecium* より発見された高頻度接合伝達性プラスミドは、新型のまったく新しい薬剤耐性プラスミドである。このプラスミドにより、*E. faecium* の薬剤耐性の拡散因子として、細菌学的にも、厚生労働行政的にも重要と考えられる [池 康嘉]。

(2) これまでの研究で開発された薬剤耐性菌の迅速検出方法を臨床分離菌等に適応し、その有用性の研究報告が成された。メタロ・ β -ラクタマーゼの検出方法 [荒川 宜親]、薬剤排出ポンプとニューキノロン耐性およびアミノ配糖体耐性 [後藤 直正]、黄色ブドウ球菌のアミノ配糖体不活化酵素の検出方法 [堀田 国元]、気道感

感染症起因菌の検出方法の研究[生方 公子]等である。

(3) 新たな検出方法の開発の研究。気道感染症起因菌の起因菌の検出方法[生方 公子]、メタロ・ β -ラクタマーゼの検出方法[後藤 正文]、チフス菌のキノロン耐性菌の検出方法[渡辺 治雄]。

(4) 問題となる薬剤耐性菌の基礎的研究。VanD型VREの研究[池 康嘉]。食中毒起因サルモネラの薬剤耐性の研究[山本友子]。

G. 研究成果

1. Yoshida H, Tateishi R, Arakawa Y, Sata M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Ishibashi H, Yamada G, Yokosuka O, Shiratori Y, Omata M. Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C. *Gut*. 2004 53(3):425-30.
2. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama K, Kato H, and Arakawa Y. Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004 48(2) 491-6.
3. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003 6:362(9399):1888-93.
4. Nagano N, Shibata N, Saitou Y, Nagano Y, Arakawa Y. Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type beta-lactamase. *J. Clin. Microbiol.* 2003 41(12):5530-6.
5. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* 2003 41(12):5407-13.
6. Kurokawa H, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Kamachi K, Yagi T, Arakawa Y. A new TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase (TEM-91) with an R164C substitution at the omega-loop confers ceftazidime resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003 47(9):2981-3.
7. Tomita H. and Ike Y. Tissue Specific Adherent *Enterococcus*

- faecalis* Strains that show Highly Efficient Adhesion to Human Bladder Carcinoma T24 Cells also adhere to Extracellular Matrix Proteins. 2004 *Infect.Immun.* (in press)
8. Tomita H, Tanimoto K, Hayakawa S, Morinaga K, Ezaki K, Oshima H, Ike Y. Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying Tn1546-like transposons that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.* 2003 185(23):7024-8.
 9. Matsuoka M, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y. Characteristic expression of three genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003 Mar 28;220(2):287-93.
 10. Kaieda S, Okitsu N, Yano H, Hosaka Y, Nakano R, Okamoto R, Takahashi H, Inoue M. Induction of telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003 Oct;52(4):736-7. Epub. 2003 Sep 01.
 11. Nagano N, Sato J, Cordevant C, Nagano Y, Taguchi F, Inoue M. Presumed Endocarditis caused by BRO β -lactamase-producing *Moraxella lacunata* in an infant with Fallot's Tetrad. *J. Clin. Microbiol.* 2003 41(11):5310-2.
 12. Inoue M, Lee NY, Hong SW, Lee K, Felmingham D. PROTEKT 1999-2000: a multicentre study of the antibiotic susceptibility of respiratory tract pathogens in Hong Kong, Japan and South Korea. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2004 23(1):44-51.
 13. Furuhata M, Iwamura M, Baba S, Inoue M. Combined effect of clarithromycin and imipenem/cilastatin against urinary biofilm infection after pyeloplasty. *Int. J. Urol.* 2003 10(4):228-30.
 14. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sunakawa K, and Ubukata K. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbial Drug Resistance*, 2003 9: 39-46.
 15. Ubukata K. Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2003 9: 285-291(総説)