

16. Ubukata K, Iwata S, and Sunakawa K. In vitro activities of new ketolide, telithromycin, and eight other macrolide antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* having *mefA* and *ermB* genes that mediate macrolide resistance. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2003 9: 221-226.
17. 千葉菜穂子、長谷川恵子、小林玲子、鈴木悦子、岩田 敏、砂川慶介、生方公子、化膿性髄膜炎・全国サーベイランス研究班：化膿性髄膜炎例から分離された *Streptococcus pneumoniae* の疫学解析 -1993 年から 2002 年の分離株について-。 *日本化学療法学会雑誌*、2003 51: 551-560.
18. 生方公子、小林玲子、千葉菜穂子、長谷川恵子、紺野昌俊：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、 *日本化学療法学会雑誌*、2003 51: 60-70.
19. 諸角美由紀、岩田 敏、遠藤廣子、大石智洋、大成 滋、川村尚久、黒木春郎、小林正明、斉藤洪太、酒井律子、砂川慶介、田島 剛、新田雅彦、野々山勝人、小林玲子、千葉菜穂子、生方公子： *Mycoplasma pneumoniae* の迅速検索を目的とした PCR -小児呼吸器感染症検体を用いて-。 *日本化学療法学会雑誌*、2003 51: 289-299.
20. Kuroki H, Morozumi M, Chiba N, Ubukata K. Characterization of children with *Mycoplasma pneumoniae* infection detected with the rapid polymerase chain reaction technique. *Journal of Infection and Chemotherapy*, (in printing)
21. Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Iwata S, Murayama SY, Sunakawa K, and Ubukata K. Rapidly increasing prevalence of  $\beta$ -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (in printing)
22. Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, Murayama SY, K. Sunakawa: Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* responsible for meningitis in Japan, 1999-2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (in printing)
23. Wanchun JIN, Yoshichika Arakawa, Hisami Yasuzaka, Tomoko Taki, Ryo Hashiguchi, Kana Mitsutani, Asumi Shoga, Yoshihiro Yamaguchi,

- Hiromasa Kurosaki, Naohiro Shibata, Michio Ohta, and Masafumi Goto. Comparative Study of the Inhibition of Metallo- $\beta$ -Lactamases (IMP-1 and VIM-2) by Thiol Compounds That Contain a Hydrophobic Group : (日本薬学会誌 Biol. Pharm. Bull.に投稿中)
24. Hiromasa Kurosaki, Hisami Yasuzawa, Yoshihiro Yamaguchi, Wanchun Jin, Yoshichika Arakawa and Masafumi Goto. Detection of a metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-1) by fluorescent probes having dansyl and thiol groups. *Org. Biomol. Chem*, 2003 1:17-20.
25. Hacquet D, Vogne C, Garch FE, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskata O, and Plesiat P. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2003 47:1371-1375.
26. Gotoh N, Murata T, Kimura T, Ozaki T, Kondo A, and Nishino T. Intrinsic Resistance of *Escherichia coli* to mureidomycin A and C due to expression of the multidrug efflux system AcrAB-TolC: comparison with the efflux systems of mureidomycin-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.* 2003 9:101-103.
27. Morita Y, Murata T, Mima T, Shiota S, Kuroda T, Mizushima T, Gotoh N, Nishino T, and Tuchiya T. Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003 51:991-994.
28. 後藤直正. 新世紀の感染症学 下 - ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート. 第1部 グローバル時代の感染症学 IV 感染症特論 5. 薬剤耐性菌 8) 薬剤耐性緑膿菌. *日本臨床* 2003 61: 196-201.
29. 堀田国元、土崎尚史、石野敬子、石川淳. 新しい耐性菌モニタリングの展望・迅速簡便なゲノムモニタリングによる耐性菌の動向予測. *獣医畜産新報 JVM* 2003 56(10) 846-9.
30. Nakaya H, Yasuhara A, Yoshimura K, Oshihoi Y, Izumiya H, and Watanabe H. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC*. *Emerg Infect Dis.* 2003 9: 255-257.

31. Izumiya H, Nojiri N, Hashiwata Y, Tamura K, Terajima J, and Watanabe H. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, J. Emerg. Infect. Dis. 2003 9: 1650-1651.
32. Hirose K, Tamura K, Watanabe H. Screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism. Microbiol. Immunol. 2003 47, 161-165.
33. Hirose K, Itoh K, Arakawa E, Tamura, K, Watanabe H. DNA based diagnosis method for typhoid fever and paratyphoid fever, and the screening method for *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility to fluoroquinolones by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP). ( Review ) Research Advances in MICROBIOLOGY, 2003, vol. 3, p108-117. Global Research Network, Kerale, India.
- その他研究成果は各班員の報告書の中に記載。
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得  
特許申請中  
荒川宜親：(発明の名称) グラム陰性桿菌の 16S rRNA メチラーゼの遺伝子
  2. 実用新案登録、その他  
なし

## II. 分担研究報告書（平成15年度）

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成15年度分担研究報告書

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

—アルペカシン高度耐性グラム陰性桿菌の耐性機構の解析—

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

**研究要旨**

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ペカシン（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（*rmtA*, *rmtB*）。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ちら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。

そこで、この種の16S rRNAメチラーゼ遺伝子が、院内感染症、術後感染症、日和見感染症の原因となる種々の臨床分離株に拡散する事を防止する実効ある対策を講じる事が急務となっている。

## 研究協力者：

横山佳子、土井洋平、山根一和、柴田尚宏、  
八木哲也、柴山恵吾、加藤はる（国立感染症研究所 細菌第二部）

### A. 研究目的

アルベカシン（ABK）は日本で開発された半合成アミノグリコシド（AG）系抗生物質で、グラム陽性菌からグラム陰性菌に至るまで幅広い抗菌活性を示すことを特徴としている。日本では、1990年に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）感染症の治療薬として認可され、現在臨床現場で広く用いられている。ABKは細菌が産生するアセチル化酵素、リン酸化酵素、アデニル化酵素など種々のAG修飾酵素による耐性化機構を回避することを想定して設計されており、耐性菌が出現しがたい抗生物質といわれてきた。現在までに報告されているABK耐性菌の出現についてはMRSAにおいて、ABKの最小発育阻止濃度（MIC）が12.5–25 µg/ml、即ち中等度耐性MRSAが数%出現しているという報告がある。この耐性化機構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ものであり、ABKの6'位のアミノ基と2''位の水酸基が同時に修飾を受けることにより不活化される。

しかし、1997年にABKのMICが1,024 µg/ml以上を示す超高度耐性緑膿菌が臨床分離された（AR-2株）。また2001年にはセラチアからも同様に高度耐性を有する株（S-95株）が臨床分離された。AR-2株およ

びS-95株はABK以外の種々のAG系抗生物質にも高度耐性（MIC, >1,024 µg/ml）を示し、薄層クロマトグラフィーでAGの修飾が確認できなかったことから、二機能酵素によるAGの修飾不活化とは異なる全く新規の耐性機構を獲得している可能性が示唆された。院内感染の原因菌である緑膿菌やセラチアでこのような株が臨床現場に広まっている可能性が考えられ、化学療法の実施において将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。本研究ではAR-2株およびS-95株からABK耐性遺伝子をクローニングし、塩基配列の決定および遺伝子産物の機能およびそれを媒介している遺伝子構造を解析した。

### B. 研究方法

#### 1. ABK耐性遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

緑膿菌AR-2株およびセラチアS-95株から全DNAを抽出し、AR-2株はHindIIIでS-95株はBamHIでそれぞれ切断した後、大腸菌用クローニングベクターであるpBCSK+のHindIIIおよびBamHI部位にライゲーションを行った。大腸菌XL-1Blueに形質転換後、得られた大腸菌クローンからプラスミドを回収し、自動DNAシーケンサー（3100 Genetic Analyzer；ABI社）により塩基配列を決定した。ホモロジー検索はFASTA法およびBLAST法を用いた。

#### 2. 接合実験

ABK耐性遺伝子がプラスミド性であるか

どうかを検討するために AR-2 株 (ABK<sup>r</sup>、CPFX<sup>r</sup>) をプラスミド供与株、緑膿菌 No.105 株 (ABK<sup>r</sup>、CPFX<sup>r</sup>) をプラスミド受容株として接合を行った。同様に S-95 株 (ABK<sup>r</sup>、RFP<sup>r</sup>) をプラスミド供与株、大腸菌 CSH2 株 (ABK<sup>r</sup>、RFP<sup>r</sup>) をプラスミド受容株として接合を行った。

### 3. MIC 値の測定

各々の抗菌薬の MIC 値の測定は NCCLS 法に準じて行った。

### 4. 遺伝子産物の 16S rRNA メチラーゼ活性の測定

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った。緑膿菌 AR-2 株について用いた粗酵素液は ABK 耐性遺伝子を緑膿菌 大腸菌シャトルベクター pT0001 にサブクロニングし、緑膿菌 PA01 に形質転換して得られたクローンより抽出したものをを用いた。セラチア S-95 株は His-tag 付きリコンビナントタンパクを合成し実験を行った。

## C. 研究結果

緑膿菌 AR-2 株およびセラチア S-95 株由来の ABK 耐性遺伝子の塩基配列を決定した結果、この遺伝子は 756 塩基、251 アミノ酸で構成されており、ホモロジー検索の結果、両者のアミノ酸配列の相同性は 82% であった。現在までに報告されている AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼ遺伝子アミノ酸レベルで相同性を調べたところ

約 30% であった。我々は緑膿菌由来の ABK 耐性遺伝子を *rmtA*、セラチア由来の ABK 耐性遺伝子を *rmtB* と命名した。数種の AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼおよび RmtA, RmtB のアミノ酸配列の比較を Fig. 3 に示す、また、それらもとに作成したデンドログラムを Fig. 1 に示した。

大腸菌クローンにおける種々の AG 系抗生物質の MIC 値を測定した結果、RmtA および RmtB は ABK のみならず類似の基本構造を有するカナマイシン (KM) 系、ゲンタマイシン (GM) 系の抗生物質すべてに高度耐性 (MIC, >1,024 µg/ml) を付与した (Table 1)。

また接合実験において得られた接合体、AR-2 株および No.105 株の MIC 値を測定したところ、少なくともトブラマイシン (TOB)、アミカシン (AMK)、ABK、イセパマイシン (ISP) についての耐性が伝達されていることが明らかとなった (Table 1)。S-95 株は接合実験では耐性は伝達されなかったが、プラスミドを抽出しエレクトロポレーション法により大腸菌 XL-1Blue を形質転換したところ AG 耐性は伝達された。

RmtA および RmtB の 16S rRNA メチラーゼ活性を測定した結果、RmtA を含む粗酵素抽出液を酵素溶液として用いた場合、30S サブユニットへの放射活性の取り込みが強く認められた (Fig. 2)。RmtB では His tag 付き RmtB を合成し実験を行ったところ同様に放射活性の取り込みが認められた。

*rmtA* の周辺構造を調べた結果、*rmtA* およびその周辺の 6.2 kbp は水銀耐性遺伝子を

保有するトランスポゾンである Tn5041 内に挿入される形で存在した。また *rmtB* は Tn3 のすぐ下流に位置する事が判明した。

#### D. 考察

今回クローニングした *rmtA* および *rmtB* の産物は、AG 産生放線菌が産生する 16S rRNA メチラーゼと約 30% の相同性があり、KM 系および GM 系の抗生物質全てに高度耐性を付与した。またメチル基取り込み実験より、16S rRNA メチラーゼ活性を有することが強く示唆された。またこれらの遺伝子の周辺構造を調べるとこの遺伝子を保有する緑膿菌およびセラチアのゲノムとは全く異なった構造をしており、遺伝子の転位に関係するトランスポゾンと関係が深いことが判明した。これらの結果は、これらの耐性遺伝子が放線菌に代表される AG 産生菌から由来している可能性を示唆するものである。

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 の特定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、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、リボソームの立体構造の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ことが報告されている。また接合実験結果から他の緑膿菌株に伝達することが判明した。また、*rmtA* や *rmtB*

遺伝子トランスポゾン様の遺伝子構造に媒介されていることから、これらの結果は、今後、臨床現場においてこれらの耐性遺伝子がグラム陰性桿菌の間に拡散し、各種のアミノグリコシドに超高度かつ多剤耐性を獲得した緑膿菌やセラチアなどのグラム陰性桿菌が増加する危険性を示しており、AG の適正使用の推進とともにその動向の監視が強く臨まれる。

#### E. 結論

本研究により、全く新しい AG 高度耐性メカニズムを獲得した緑膿菌やセラチアが臨床現場に出現したことが確認された。

院内感染症や術後感染症の原因菌である緑膿菌およびセラチアにおいて、臨床現場で使用頻度が高い AG 系抗生物質全般に対し高度耐性を付与する、新規な耐性機構を獲得した臨床分離菌の出現は、化学療法実施の上で将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。また、これらの遺伝子がプラスミド上に存在することから、グラム陰性菌間における伝播拡散の危険性が強く懸念される。

#### F. 健康危険情報

我々の予備調査では 1997 2002 年度に臨床分離された緑膿菌 1,113 株中、少なくとも 9 株が *rmtA* 遺伝子を保有していた。これら 9 株について、パルスフィールド電気泳動により解析を行ったところ、それらは全く異なるバンドパターンを示したことが



ら、*rmtA*がプラスミドを介して異なる緑膿菌株間に接合伝播し、拡散しつつある可能性が強く示唆された。*rmtB*を保有するセラチアは現在のところ1例のみであるがこの遺伝子を保有する大腸菌、肺炎桿菌も臨床現場から分離されている。これらの株は、現在臨床現場で用いられている多種類のAG系抗生物質に耐性を与えるため、临床上極めて危険性が高い。現在実施されている「院内感染対策サーベイランス事業」などの中で、16S rRNA メチラーゼ遺伝子保有緑膿菌の分離状況、他菌種への同遺伝子の伝播状況の把握を検討項目として付け加える必要がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. K. Yokoyama, Y. Doi, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, H. Kato, Y. Arakawa. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet 2003; 362: 1888-1993.
2. Y. Doi, K. Yokoyama, K. Yamane, J. Wachino, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance

to aminoglycoside. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 491-496.

### 2. 学会発表

1. K. Yamane, Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, N. Shibata, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa: Genetic environment of 16S Ribosomal RNA Methylase (*magra*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* conferring Resistance to Aminoglycosides. American Society for Microbiology 103rd General Meeting, Washington DC, USA, May, 2003
2. 山根一和、土井洋平、和知野純一、八木哲也、柴田尚宏、柴山恵吾、加藤はる、荒川宜親：グラム陰性桿菌に高度アミノグリコシド耐性を付与する16S rRNA methylaseの保有状況 第86回日本細菌学会関東支部会、横浜、10月、2003年

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許申請中

(発明の名称)グラム陰性桿菌の16S rRNA メチラーゼの遺伝子

### 2. 実用新案登録、その他

なし

Table 1. MICs for parental strain, transformants and transconjugant

Antimicrobial agents	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) for									
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i> XL1-blue		<i>P. aeruginosa</i> PAO1		<i>P. aeruginosa</i>			
	AR-2	H9	H9-13	pBC	pTORmtA	pTO001	Transconjugant	No.105 <sup>a</sup>		
4,6-substituted deoxystreptamines										
Kanamycin groups										
Arbekacin	>1,024	>1,024	>1,024	0.5	>1,024	1	>1,024	>1,024	4	
Amikacin	>1,024	>1,024	>1,024	1	>1,024	8	>1,024	>1,024	4	
Kanamycin	>1,024	>1,024	>1,024	2	>1,024	128	>1,024	>1,024	>1,024	
Tobramycin	>1,024	>1,024	512	1	>1,024	1	>1,024	>1,024	256	
Gentamicin groups										
Gentamicin	>1,024	>1,024	1,024	0.5	>1,024	256	>1,024	>1,024	>1,024	
Sisomicin	>1,024	512	>1,024	0.5	>1,024	256	>1,024	>1,024	>1,024	
Isepamicin	>1,024	>1,024	>1,024	0.5	>1,024	4	>1,024	>1,024	8	
4,5-substituted deoxystreptamine										
Neomycin	>1,024	4	2	4	512	16	>1,024	>1,024	>1,024	
Other aminoglycosides										
Streptomycin	128	4	2	4	32	32	>1,024	>1,024	>1,024	
Hygromycin B	1,024	64	2	32	512	512	1,024	1,024	512	
Others										
Ceftazidime	2	0.5	0.25	0.25	ND <sup>b</sup>	ND	128	128	32	
Imipenem	1	0.25	0.25	0.125	ND	ND	16	16	16	
Ciprofloxacin	0.25	0.125	0.125	0.125	ND	ND	64	64	64	

<sup>a</sup>No.105: recipient for the conjugation study

<sup>b</sup>ND, not determined.

Figure 1

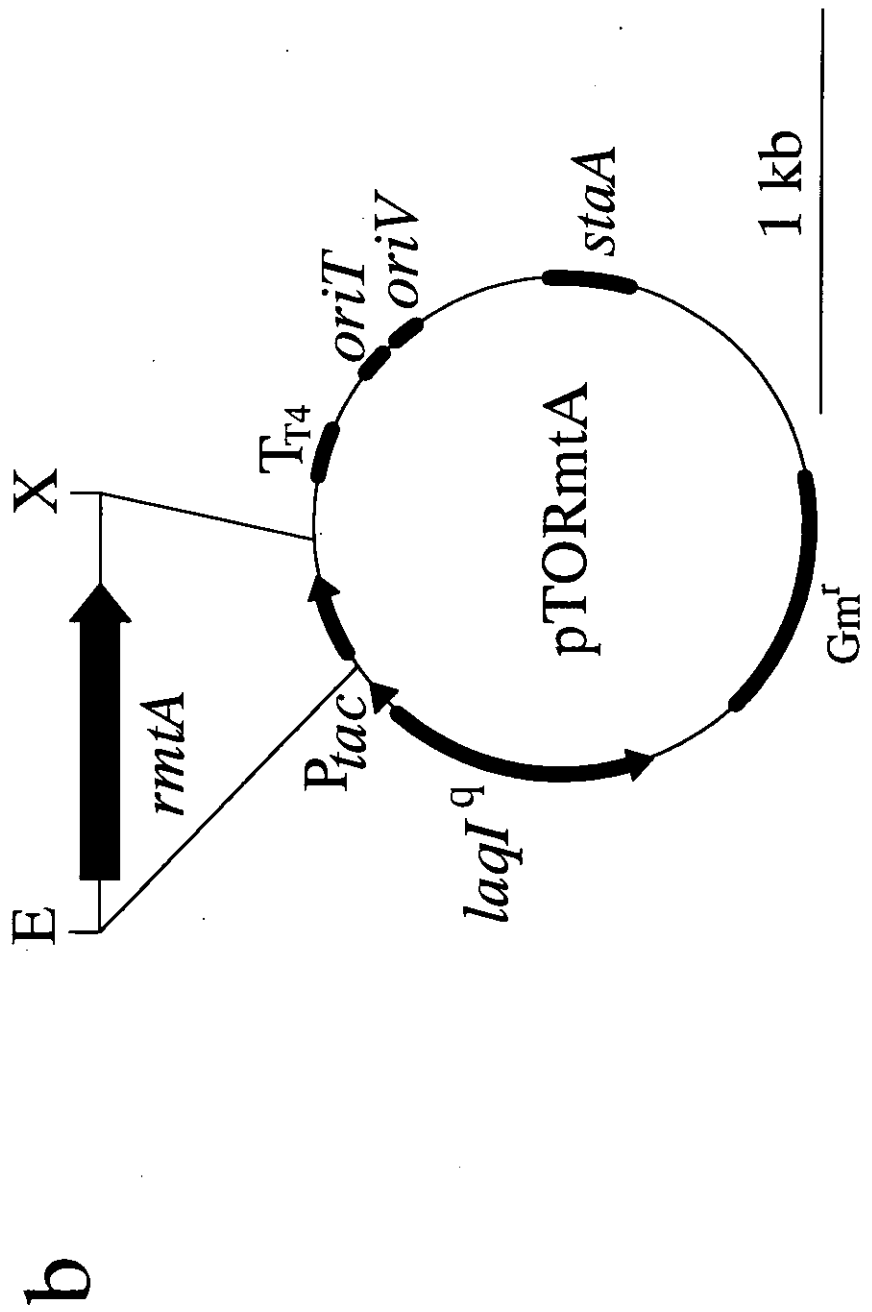
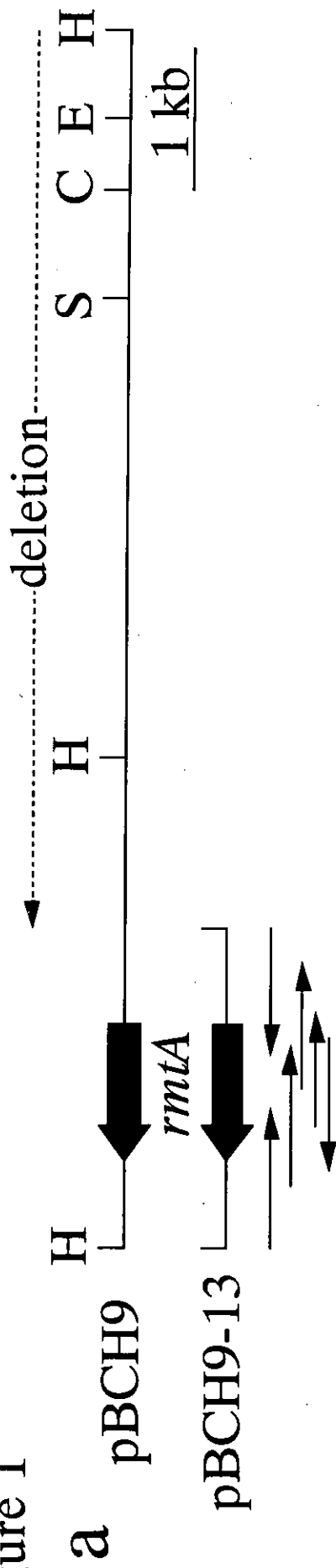


Figure 2

ACCATCCCGAGTGTGGCCITCCACTGCGATTAATTCATATGCTATCCCGCCGATCTGGTCTCAGGGCCATGGCCATGGCGGCAGA 90  
H P E L W P S Y C D N S Y A I R P D L V L S G H A H G G Q I  
TCCGCTCCCATGGATGGGGTCTTGGCCCAATCAAGGTTCTCCCTAAGTATACCTCCGCGCTATCCGCGACACAAATGSCA 180  
R L P W I G G L L A P N Q G F F P K Y T S G H Y A A D N G T  
-35  
CCCAATGATGTCAGCCCGGCTGGCCATAGACTCTTCCGCTGGGTTATCAATGGCCGCAATTCGGGTCATCAGCTACCGG 270  
Q M I V S R G L G N S I F P V R V F N R P H L P V I T L T G  
G TGGTAGGGTACCGGAGGTATAGGATCAITATGCAATGCAATGAGCCGCGCAGCAATCCACCACAGCAGGACACACATGACCTTT 360  
G \* S D M S F 3  
GACCATGCCCTAGCGTCCCTTCCTCAAAAATAATGTTCCCTCTGCCCGGATACCGGTAGCGGGAATTTAGATCAGCAATGGGG 450  
D A L A S I L S S K K Y R S L C P D T V R R I L D Q E W G 33  
CCGCACAAATCGGCTAAGCTGAGGAGGCGACATCCACCGGCTCCACCGCATTTCCGGCCCTATGTCAGCCGGAATGCTCAG 540  
R H K S P K L A V E A T R T R L H G I C G A Y V T P E S L K 63  
GCTCCAGCAGCGGCATATCGGTGGCGATGTCGAAAGGACTGTGCTGACGCGCTATCAGAGGAGCGGTTGGCGAATGGACTCC 630  
A A A A L S V G D V Q K A L S L H A S T K E R L A E L D C 93  
CTCTAGATTTTATCTTTCGGGGGTCCCGCATGGGTTGGATTCGGGATTCGGGCTTAAACCGGCTGGCCCTTTATACGGTAC 720  
L Y D F I F S G G V P H R V L D I A C G L N P L A L F I R D 123  
ATAACATCTGTATGGCGTCCGACATCCCATCAGGCTTGGCGATGTCACCCCGCTTCCCATCAACAGGATTCAGTTCAGTTC 810  
I T S V W A C D I H Q G L G D V I T P F A H H Q G L D F T F 153  
GCGCTCCAGGATGTGTACCGCGCCACATGACAGCGCGGATTCGGACTGGTATTTAATTAATCTCCCTTCTGCGAGAGCAA 900  
A L Q D V M C T P P T E T G D L A L V F E K L L P L L E R E Q 183  
GCTGGCCCGCCATCGCCCTACCCAGCCACATACCTCCGATTCGGCTCAGCTCCCGCCCGGATTCAGGCGGCGCGGCGCAG 990  
A G A A M A L L Q A L A T P R I A V S F P T R S L G R G K 213  
GGCATGGAAGCAACTATTCGGCATGGTTCGAGCGCCACATCGCTGATCAATTTGAATTCAGGATPCCAGACCATTCGGAATGAGCCTT 1080  
G M E A N Y S A W F E G A L P D E F E I E D T K T I G I E L 243  
GTGTACATGATAAAAAGGATATAGTACCTAGCCAGGAGCAACCCCTACCCCTCTATATATAAAAAGGACGAAATAATGTTTGGT 1170  
V Y M I K R N K \* 251  
TCCCTCTTGTATATCCACTACACAGCTATGATGCTGTGTTGTTGATGAGCGGCTTATGAGTTCAGTCTATCCCGCCCGCCAGCG 1260  
\* S Q Q K K L L R K Y T L E I G L A G L  
GTGGTTCAGCAAGATAGCGAGATTCGCCACCGCTAGTATCGCTTCGCGCTCAGCCCGCTCAGCGGATTCGACCAATCGCAG 1350  
P A T L E I A L I A V A L I A E G G S L G M S L P I S G I A

Fig. 3 B mt. A, B mt. B と放線菌が産生する16S rRNAメチラーゼのアミノ酸配列の比較検討

P. aeruginosa /RmtA	1	MFDDALASLSK	NYRSL	OPTVIFLDQBGVGRKSKPLAVEAT	46
S. marcescens /RmtB	1	MNDALISLAK	KYRALCD	IVRRLITTEWGFHSPKQIVYEA	46
K. pneumoniae /AmA	1	MKNDAAKLESK	KYENDSD	MEKVAKSSKRYKUYEY-INY	43
M. purpurea /CmtA	1	MITSAFE	DHDDG	VEGKISRYIVAPATVFLAPALVAEQDVFDAWR	52
S. hindustanus /Nrb	1	MHPAFQPKAD	MRFLAEVMAAF	SSRYGVAETVFLAANVAISGLAEAVKR	53
S. karumyobius /Knr	1	MSGSASDE	DRKTRV	VEAFQGRRSYDQAVRRLAPALAVEGDYVIRATR	54
S. terrestris /KntB	1	MITSAFE	DHDDG	VEGKISRYIVAPATVFLAPALVAEQDVFDAWR	52
M. rosea /CmtB	1	MITSTCD	DRODL	QDQIKSRYIVAPATVFLAPALVAEQDVFDAWR	52
* . . . *					
P. aeruginosa /RmtA	46	RT-RHNDGCA	YVITESL	KAAAALSVGDGDKA-L-SHA-S-TKERLAEL	91
S. marcescens /RmtB	46	RT-RHNDGCA	YVITESL	KAAAALSVGDGDKA-L-SHA-S-TKERLAEL	91
K. pneumoniae /AmA	44	SKKKLHDMGCS	YYSVY	MDKLIK-KWGGQISEDLKHS-TNERVAIT	93
M. purpurea /CmtA	53	TKRQLHEVYCAF	PPSPRYAAL	RLQDSAVDAGDDEAVRAALFRAMSHVSTIE RLRL	112
S. hindustanus /Nrb	59	TKRSJHEVYCAF	UPSFP-KYD	ALLRQLRDVAVDAGDDEAVRAALFRAMSHVSTIE RLRL	117
S. karumyobius /Knr	55	TKRQLHEVYCAF	MPITPK	YEAULDVFEALDDEFEARLAKPAGLGHSSITERLPL	113
S. terrestris /KntB	53	TKRQLHEVYCAF	PPSPRYAAL	RLQDSAVDAGDDEAVRAALFRAMSHVSTIE RLRL	112
M. rosea /CmtB	53	TKRQLHEVYCAF	PPSPRYAAL	RLQDSAVDAGDDEAVRAALFRAMSHVSTIE RLRL	112
* . . . * . . . * . . . *					
P. aeruginosa /RmtA	92	DLYDFSSGMPHRV	LDA-CCLN	PLAUFRRDIS-WWAG-DHFDGLDMITPFAHI	146
S. marcescens /RmtB	92	DLYDFSSGMPHRV	LDA-CCLN	PLAUFRRDIS-WWAG-DHFDGLDMITPFAHI	146
K. pneumoniae /AmA	94	NDFYVFNQK	HSSLDLFG	CGFNRALYGNWENKQNHAYDQBARAFSSSEK	152
M. purpurea /CmtA	113	AEFYQETRAP	QPNIL	RELACGLAPLAPWMLSDQTVWASDARLDFVDAALIR	171
S. hindustanus /Nrb	118	EEFYEFARLD	PTSVFLA	CGNPLAAPPWFGSDAFTYHNSDITRTEFLAAALET	176
S. karumyobius /Knr	114	TEMYAEVRLD	IPATVRL	ACGANNPLTYMMPUPAGITVLSDDHRMDFAGVATA	173
S. terrestris /KntB	113	AEFYEFARLD	PTSVFLA	CGNPLAAPPWMLSDQTVWASDARLDFVDAALIR	171
M. rosea /CmtB	113	DEFYEFARLD	PTSVFLA	CGNPLAAPPWMLSDQTVWASDARLDFVDAALIR	171
* . . . * . . . * . . . *					
P. aeruginosa /RmtA	147	QGLDFTALD	DMCPTTETD	LAL-VFKLPLLEFEGAGAAALQALAIFRAVSPPT	206
S. marcescens /RmtB	147	KDMDFITAL	DMCPTTETD	LAL-VFKLPLLEFEGAGAAALQALAIFRAVSPPT	206
K. pneumoniae /AmA	153	LKTRVFLKESD	YKGIYDWF	LUMPLAKQDQANLDFLQLRHTQNFVSEFR	210
M. purpurea /CmtA	172	LGVAHRTSM	DLLEDRLE	PTDVTLLKTLPLQLETRFSSGEMDMVNSFWITPT	230
S. hindustanus /Nrb	177	LGVAHRTSM	DLLEDRLE	PTDVTLLKTLPLQLETRFSSGEMDMVNSFWITPT	230
S. karumyobius /Knr	174	LGVAHRTSM	DLLEDRLE	PTDVTLLKTLPLQLETRFSSGEMDMVNSFWITPT	230
S. terrestris /KntB	172	LGVAHRTSM	DLLEDRLE	PTDVTLLKTLPLQLETRFSSGEMDMVNSFWITPT	230
M. rosea /CmtB	172	LGVAHRTSM	DLLEDRLE	PTDVTLLKTLPLQLETRFSSGEMDMVNSFWITPT	230
* . . . * . . . * . . . *					
P. aeruginosa /RmtA	206	PSLGGGKQK	QHEANSAMF	EGALPDE-FEEDTKTISELVMM-K-FRK	251
S. marcescens /RmtB	206	PSLGGGKQK	QHEANSAMF	EGALPDE-FEEDTKTISELVMM-K-FRK	251
K. pneumoniae /AmA	211	KSLGKQK	QHEANSAMF	EGALPDE-FEEDTKTISELVMM-K-FRK	257
M. purpurea /CmtA	231	KSLGKQK	QHEANSAMF	EGALPDE-FEEDTKTISELVMM-K-FRK	274
S. hindustanus /Nrb	233	KSLGKQK	QHEANSAMF	EGALPDE-FEEDTKTISELVMM-K-FRK	281
S. karumyobius /Knr	231	KSLGKQK	QHEANSAMF	EGALPDE-FEEDTKTISELVMM-K-FRK	277
S. terrestris /KntB	231	KSLGKQK	QHEANSAMF	EGALPDE-FEEDTKTISELVMM-K-FRK	274
M. rosea /CmtB	231	KSLGKQK	QHEANSAMF	EGALPDE-FEEDTKTISELVMM-K-FRK	274

Figure 4.  
16S rRNA メチラーゼ

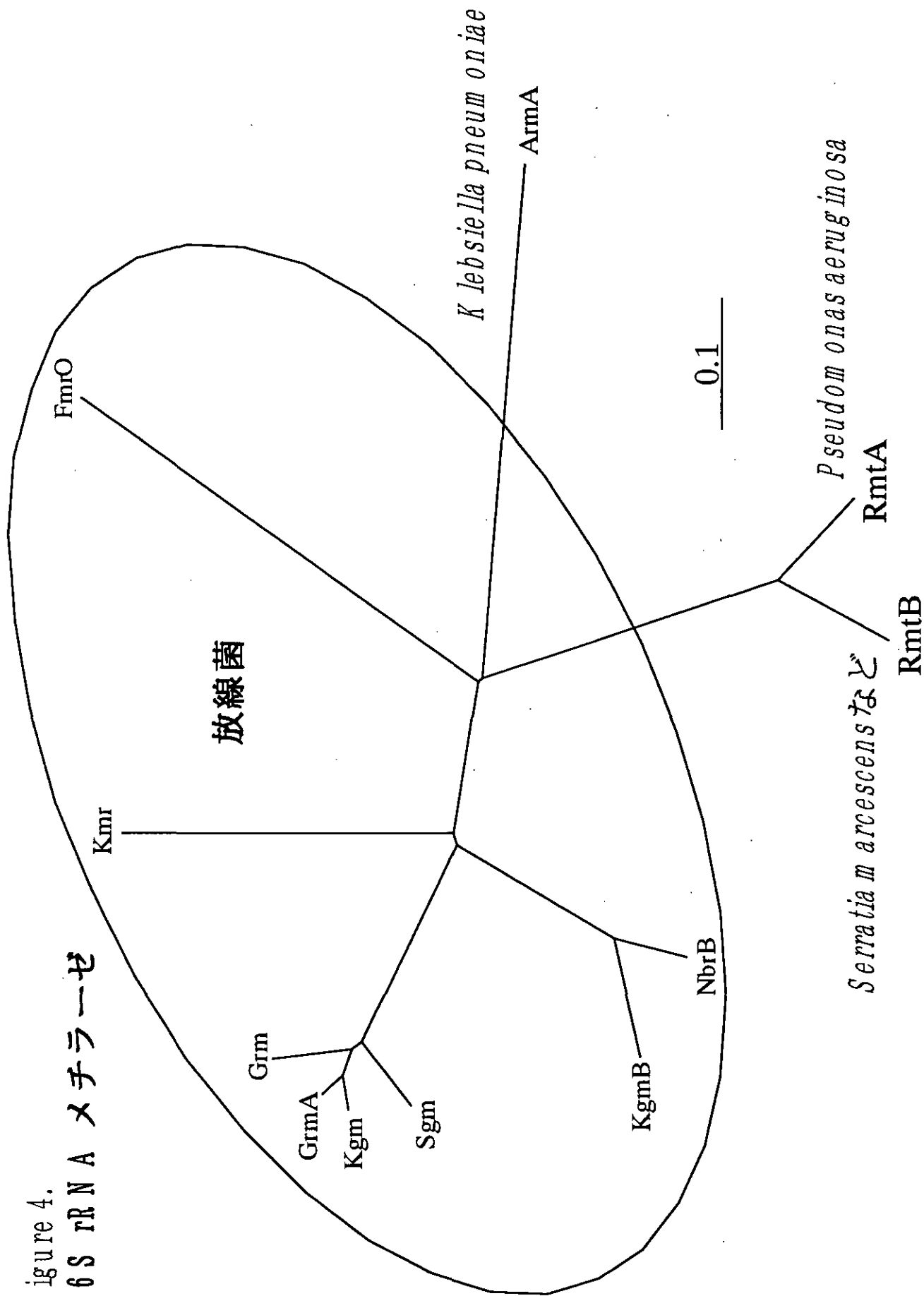
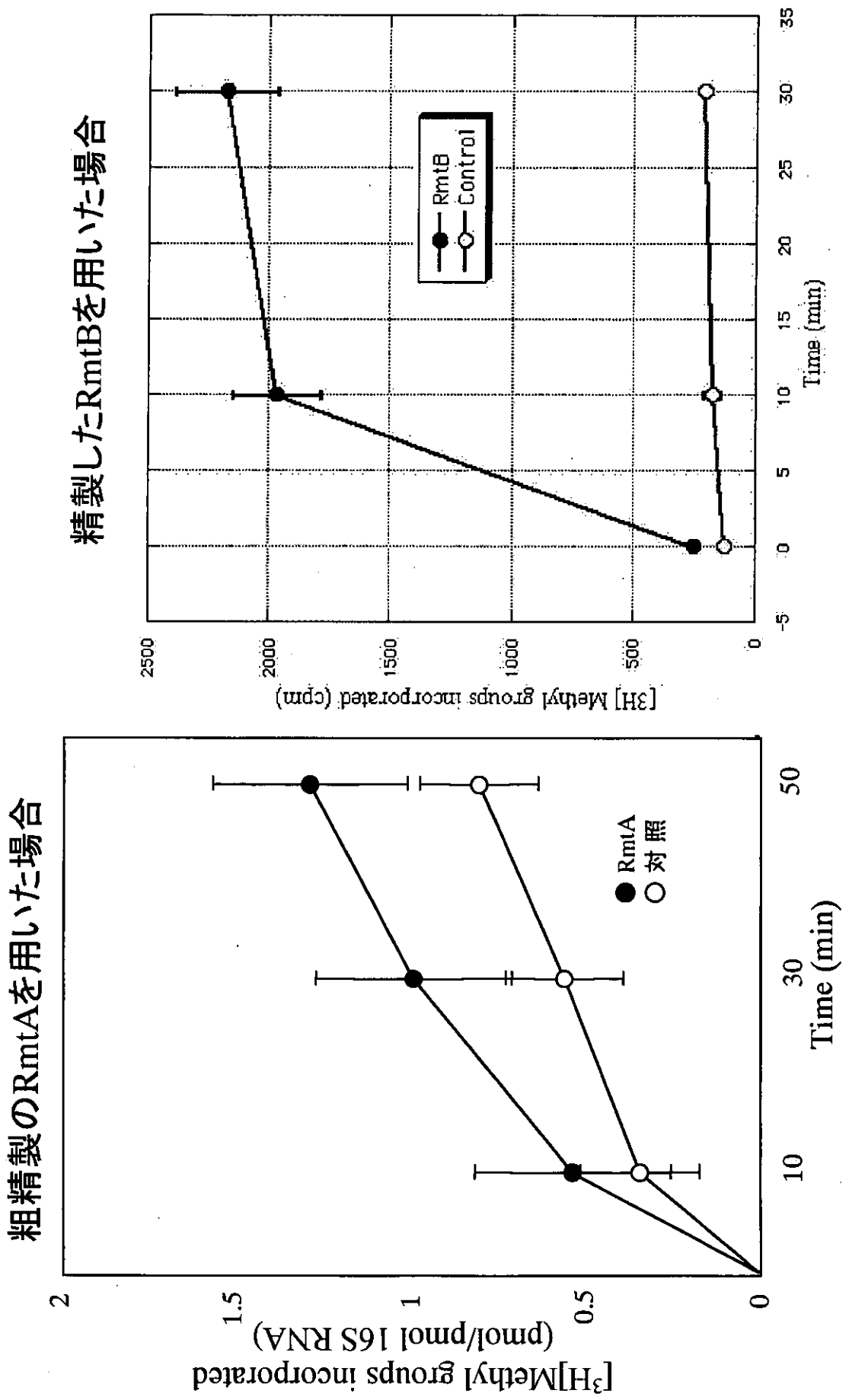


Figure 5.  $[^3\text{H}]$ ラベルしたS-アデノシルメチオニンを基質とし、メチル化反応を測定



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  
—国内で分離されたメタロ-β-ラクタマーゼの遺伝子型別—

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

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、2001-2002年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試みた。

その結果、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*, *Klensielliella 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。

我が国においてMBLを産生する株が、各種の病原性グラム陰性桿菌に広がりつつある事が確認されたため、今後の広がりを監視するとともにそれらを増やさないための実効性のある対策を急ぐ必要がある。

研究協力者：

柴田尚宏、山根一和、和知野純一、土井洋平、  
八木哲也、柴山恵吾、加藤はる、甲斐久美子  
(国立感染症研究所 細菌第二部)

ベネム-ベタミブロン (PAPM/BP)、メロベネム (MEPM)、ピアベネム(BIPM)などは、日本で開発されたカルバペネム系抗生物質で、グラム陽性菌からグラム陰性菌に至るまで幅広い抗菌活性を示すことを特徴としている。国内では、1987年にIPM/CS、1993年にPAPM/BP、1995年にMEPM、2001年にBIPMと各種のカル

A. 研究目的

イミベネム-シラスタチン (IMP/CS)、パニ



バベネム薬が相次いで認可され、細菌感染症の治療薬として重要な役割を果たしている。しかし、院内感染症の起因菌として問題となっている *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) や *Serratia marcescens* などにおいて 1990 年代より IPM 高度耐性株 (MIC, >128 $\mu$ g/ml) が国内の医療施設において散発的に分離されるようになり、荒川らは、*S. marcescens* の臨床分離株より IMP-1 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) を世界で最初に発見した。その後、国内各地の医療施設で MBL を産生するカルバペネム耐性株が散見されるようになり、現時点では国内ほぼ全ての都道府県の医療施設から MBL 産生株が報告される事態となっている。

そこで、国内の医療施設で分離された広域セファロスポリン耐性グラム陰性桿菌の産生する MBL の遺伝子型別を PCR により行った。

## B. 研究方法

### 1. 試験に用いた菌株

2001 年 1 月より 2002 年 12 月までの間に国内の医療施設から検査の依頼のあった 978 株のグラム陰性菌のうち、セフトジジムとスルベラゾンとともに高度耐性 (MIC,  $\geq 128 \mu$ g/ml) を獲得した 587 株 (ただし *Acinetobacter baumannii* については、MIC,  $\geq 16 \mu$ g/ml) について解析を行った。MBL の産生性を検出するため、メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) による阻害試験をスクリーニング試験として実施した。

### 2. PCR 解析

表 1 に示す PCR 用プライマーを用いて PCR 解析を行った。

### 3. *intI3* 遺伝子陽性株の PFGE

クラス 3 インテグロンの特徴である *intI3* 遺伝子陽性株については、菌株の遺伝的関連性を確認する為、定法により PFGE 解析を行った。

## C. 研究結果

セフトジジムとスルベラゾンとともに耐性を獲得した 587 株について、SMA を用いた MBL 産生性試験を実施した結果、431 株について陽性と判定された (Fig. 1, Table 2)。

そこで、その 431 株について Table 1 に示す PCR プライマーを用いて解析を行ったところ、Table 3 に示すように IMP-1, IMP-2, VIM-2 型  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子が各々検出された。

Table 3 に示すごとく、IMP-1 型 MBL は 357 株より検出され、*P. aeruginosa*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *P. putida/fluorescens*, *S. marcescens*, *Acinetobacter baumannii* の順であった。VIM-2 型 MBL は 67 株より検出され、それらは全て *P. aeruginosa*, *P. putida/fluorescens* であった。IMP-2 型 MBL 産生株は 7 株であったが、それらは、*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *A. lwoffii* であった。

インテグロンの型別では、MBL 産生株 431 株の大半の 427 で *imI1* 遺伝子が確認されたが、4 株の *P. putida* からは *intI1* と *intI3* の両方の遺伝子が検出された (Table 4)。また、それらは、IMP-1 型 MBL を産生する株であった (Table 5)。

*intI1* と *intI3* の両方の遺伝子を保有する *P. putida* は、西日本の 2 つの医療施設より分離されたが、1 施設より分離された 3 株は、

同じ PFGE パターンを示した(Fig. 2)。

#### D. 考察

今回の調査により、国内で臨床分離されるグラム陰性桿菌の中には、既に IMP-1 型 MBL 産生株が広く分布し、さらに欧米で多く分離されている VIM-2 型 MBL 産生株も各地の医療施設に分布している明かとなった。また、IMP-2 型は少数に留まるものの、*Acinetobacter baumannii* で IMP-2 型 MBL 産生株が検出されたことから、今後さらに、*P. aeruginosa* やその近縁の *P. putida/fluorescens* を含むブドウ糖非発酵菌群における MBL 産生株の増加を警戒する必要がある。また、*Serratia marcescens* のみならず、*Klebsiella* 属菌や *E. coli* などの腸内細菌科でも、MBL 産生株が各地より分離されつつあり、今後の動向に注意する必要がある。

我が国で最初に確認されたクラス 3 のインテグロンは、今回の調査では未だ稀な状態である事が確認されたが、最近、海外でもクラス 3 のインテグロンを保有する *Klebsiella pneumoniae* が報告 (EMBL accession No. AY219651) されており、今後、各種の耐性遺伝子を媒介しつつ増加する事が懸念される。

MBL を産生することで、「切り札」的な抗生物質であるカルバペネムをはじめ、セファマイシンや広域セファロスポリンに耐性を獲得した緑膿菌やセラチアなどのグラム陰性桿菌を増加させないために、今後もそれらの継続的監視とともに抗菌薬の適正使用の推進が強く望まれる。

#### E. 結論

本研究により、国内で分離されるカルバペネム耐性の緑膿菌やセラチアが産生する MBL の遺伝子型が概ね把握された。

院内感染症や術後感染症の原因菌である緑膿菌およびセラチアにおいて、臨床現場で使用頻度が高いカルバペネム系抗生物質に対し高度耐性を付与する、MBL の産生能力を獲得した臨床分離菌の出現は、化学療法実施の上で将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。また、これらの遺伝子がプラスミド上に存在することから、今後、さらに各種のグラム陰性桿菌において MBL 遺伝子の伝播拡散の危険性が強く懸念される。

#### F. 健康危険情報

我々の予備調査では 2001 2002 年の 24 ヶ月間に臨床分離された広域β-ラクタム薬耐性の緑膿菌など 978 株中、少なくとも 431 株がメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) の遺伝子を保有している事が判明した。MBL 遺伝子を保有する株は、カルバペネムやセファマイシンなどの臨床的に重要なβ-ラクタム薬に広範な耐性を示す傾向があり、それらの増加は、臨床上大きな問題となる。したがって、今後も引き続き、MBL 産生株の動向を監視するとともに、抗菌薬の適正使用も含め、実効ある対策を急ぐ必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

3. 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 Dec;41(12):5407-13.

## 2. 学会発表

1. 当院で分離されたメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の臨床的検討, 吉田耕一郎、二木芳人、宮下修行、小橋吉博、河口豊、荒川宜親、柴田尚宏、松島敏春, 日本化学療法学会, 2003
2. 当研究所におけるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の検出状況, 飯田真佐栄、柴田尚宏、荒川宜親, 日本医学検査学会, 2003
3. 当院で分離したメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生株 7 症例の臨床的検討, 中野学、井端英憲、柴田尚宏、荒川宜親, 日本感染症学会, 2003
4. IMP-1 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を担うクラス 3 型インテグロン構造の解析, 和知野純一、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、八木哲也、横山佳子、柴山恵吾、黒川博史、伊藤秀郎、荒川宜親, 日本細菌学会, 2003
5. *Pseudomonas putida* におけるクラス 3 型インテグロンに担われるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の解析, 柴田尚宏、和知野純一、土井洋平、山根一和、八木哲也、横山佳子、柴山恵吾、黒川博史、荒川宜親, 日本細菌学会, 2003
6. Genotyping of Metallo- $\beta$ -Lactamases

Produced by *Chryseobacterium* and *Myeroides* Species in Japan. N. Shibata, Y. Doi, H. Kurokawa, T. Yagi, K. Shibayama, Y Arakawa, 103rd ASM General Meeting. 2003

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特記すべきものなし

### 2. 実用新案登録、その他

特記すべきものなし

表1 メタロ-β-ラクタマーゼとインテグラーゼを検出するPCRプライマー

PCR primer for	Sequence	Expected size of amplicon (bp)	Reference
<b>MBL gene</b>			
<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	F1: 5'-ACC GCA GCA GAG TCT TTG CC-3'	587	Shibata, N. et al.
	R1: 5'-ACA ACC AGT TTT GCC TTA CC-3'		
<i>bla</i> <sub>IMP-2</sub>	F2: 5'-GTT TTA TGT GTA TGC TTC C-3'	678	Shibata, N. et al.
	R2: 5'-AGC CTG TTC CCA TGT AC -3'		
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	F3: 5'-AGT GGT GAG TAT CCG ACA G-3'	261	Tsakris, A. et al.
	R3: 5'-ATG AAA GTG CGT GGA GAC-3'		
<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	F4: 5'-ATG TTC AAA CTT TTG AGT AAG-3'	801	Poirel, L. et al.
	R4: 5'-CTA CTC AAC GAC TGA GCG-3'		
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	F5: 5'-GCG TTT TGT TTG TTG CTC-3'	786	Shibata, N. et al.
	R5: 5'-TTG GGG ATG TGA GAC TAC-3'		
<b>integrase gene</b>			
<i>int1</i>	F6: 5'-GCA TCC TCG GTT TTC TGG-3'	457	Shibata, N. et al.
	R6: 5'-GGT GTG GCG GGC TTC GTG-3'		
<i>int2</i>	F7: 5'-CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T-3'	789	Shibata, N. et al.
	R7: 5'-GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G-3'		
<i>int3</i>	F8: 5'-ATC TGC CAA ACC TGA CTG-3'	922	Shibata, N. et al.
	R8: 5'-CGA ATG CCC CAA CAA CTC-3'		
<b>co-amplification of the</b>			
<i>int3-bla</i> <sub>IMP-1</sub> region	F9: 5'-GGT CTT GTA GGC TGT AAT TG-3'	609	Shibata, N. et al.
	R9: 5'-TTG TGG CTT GGA ACC TTT AC-3'		

Shibata, N. et al., 2003. J. Clin. Microbiol. 41:5407-5413.

Tsakris, A. et al., 2000. J. Clin. Microbiol. 38:1290-1292.

Poirel, L. et al., 2000. Antimicrob. Agents Chemother. 44:891-897. ただし論文のシーケンスに誤植があるため修正したものを示す。