

分担研究課題：セフェム系薬耐性に関わる遺伝子の迅速診断法の確立

北里大学医学部

井上松久（分担研究者）、

岡本了一、中野竜一、中野百実子、兼子謙一（研究協力者）

グラム陰性菌におけるセフェム系薬の耐性化は、それぞれその菌種の染色体上に普遍的に座位する class C 型 β -ラクタマーゼ AmpC の構造遺伝子発現を調節する複数の遺伝子変異によって調節していることが明らかとなっている。先ず *E. cloacae* 由来の AmpC をコードする遺伝子セットをクローニングし、これを *E. coli* K12 株に形質転換させ、代表的なセフェム系薬の *in vitro* 選択により耐性変異菌を分離し、これを詳細に調べた。その結果、得られた変異菌は、調べた限り全て *ampD* 変異であり、変異部位は DNA 塩基配列の結果、*ampD* の各部位に点在していた。中には、*E. coli* K12 由来に IS の挿入変異株も検出された。また、*ampD* 変異に伴って AmpC 量も増加していた。次いで、相補試験の結果少なくとも野生型 *ampD*⁺ および *ampR*⁺ 産物は、変異型遺伝子 (*ampD*、*ampR*) に対してそれぞれ優性であり、得られた変異株は *ampD* の共存によってセフェム系薬に対する MIC、AmpC 量共に低下した。

次に、実験変異株によりセフェム系薬耐性菌の遺伝子変異を特定できることが判ったことから、臨床分離セフェム系薬耐性 *E. cloacae* について遺伝子変異の特定と遺伝子迅速検出について調べた。その結果、臨床分離菌の多くが、*ampD* 変異によるセフェム系薬高度耐性化の要因となっていることが判明した。しかし、一部の耐性菌の中には、*ampR* 変異菌も検出された。

カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究：ダンシル基とチオール基をもつ蛍光剤によるメタロ-β-ラクタマーゼ(IMP-1)の検出

熊本大学大学院医学薬学研究部

後藤正文, ○黒崎博雅, 山口佳宏

β-ラクタム剤は感染症治療において頻繁に用いられている抗菌剤であり、とくに広域抗菌スペクトルを示す第三セフェム系やカルバペネム薬は近年急速に使用量が伸びている。しかし、耐性を獲得した病原菌が院内感染の要因ともなり大きな社会的問題となっている。その原因の1つにメタロ-β-ラクタマーゼの産生が挙げられる。これは、新しいβ-ラクタム加水分解機構をもつので既存のβ-ラクタマーゼ阻害剤には無効であり、カルバペネムを含むほとんど全てのβ-ラクタム剤を不活化する。中でもIMP-1はその遺伝子が伝達性プラスミド上に存在することから菌種を超えた伝播が可能であり、その世界的な蔓延が危惧されている。そのため、感染菌のメタロ-β-ラクタマーゼ産生の有無を初期段階で確認することは化学療法において極めて重要である。そこで、蛍光プローブ法による簡易検出を目指し、メタロ-β-ラクタマーゼ(IMP-1)の活性中心に存在する亜鉛(II)に特異的に結合するチオール基と蛍光発色団のダンシル基を有するDansylCnSH(n = 2-6)を合成した(図1)。そしてIMP-1との相互作用を蛍光スペクトルにより検討を行い、さらにIMP-1との複合体のX線結晶構造解析を行った。以下に本研究で得られた知見を要約する。

(1) DansylCnSH (n = 2-6) は340 nmで励起すると535 nm付近で発光した。IMP-1が共存すると蛍光強度は増大し、極大波長は低波長側へシフトした。亜鉛含有酵素, カーボニックアンヒドラーゼ存在下では蛍光強度の増大は観測されずIMP-1に結合することが示唆された。

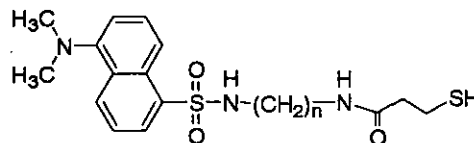


Fig. 1. Structure of DansylCnSH (n = 2-6)

(2) DansylCnSH (n = 2-6)の蛍光強度に及ぼすIMP-1の濃度の効果から、蛍光剤とIMP-1は1対1で結合し、n = 4のときに最も強く結合する。

(3) DansylCnSH (n = 2-6)はIMP-1の基質加水分解活性を拮抗阻害し、その阻害定数 K_i は、蛍光スペクトルにより求めた解離定数 K_d とほぼ一致した。

(4) IMP-1の活性中心には2個の亜鉛(II)が存在しており、DansylCnSH (n = 2-6)のチオール基がこの亜鉛(II)に結合することによってIMP-1中にとりこまれ、ダンシル基がIMP-1の疎水的環境に置かれたため、IMP-1存在下で蛍光強度は増大することが分かった。

(5) 最も強くIMP-1に結合するDansylC4SHとIMP-1との複合体のX線結晶構造解析を行った(図2)。DansylC4SHのチオール基はIMP-1活性中心の2個の亜鉛(II)に架橋して、ダンシル基は基質と結合する際に重要と考えられているフラップ部位のトリプトファン残基と疎水的な相互作用をしていることが分かった。

以上のことより、DansylCnSH(n = 2-6)はメタロ-β-ラクタマーゼ(IMP-1)と特異的に結合しタンパク質側鎖との相互作用により蛍光強度が増大することが示唆された。

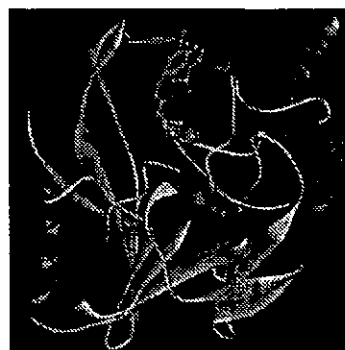


Fig. 2. X-ray crystal structure of the complex of IMP-1 with DansylC4SH

臨床分離病原菌における薬剤耐性の分子機構ならびに遺伝子型別に関する研究

柴田尚宏、山根一和、土井洋平、鈴木里和、柴山恵吾、蒲地一成、和知野純一、金井京子、加藤はる、八木哲也、荒川宜親（国立感染症研究所 細菌第二部）

【背景】昨今、臨床分離される細菌における薬剤耐性の獲得状況は、軽視できない全地球規模の緊急的事態となっている。これまで、MRSA や VRE などのグラム陽性菌で先行していた多剤耐性の獲得が、現在、緑膿菌などのグラム陰性菌でも急速に進んでおり、カルバペネムやフルオロキノロン耐性を獲得した緑膿菌は既に 20% を超える状況にある。さらに、半合成アミノグリコシドへの耐性も数%に達している。

【方法】国内の医療機関で臨床分離された様々な病原細菌について、それらにおける薬剤耐性の分子機構を解析するとともに、それに関与する遺伝子の型別、さらに、保有状況等を調査・分析した。

【結果】主な研究成果を以下に示す。

1. 臨床的に有用なほぼ全てのアミノグリコシドに耐性を付与する全く新しい分子機構として、16S rRNA メチラーゼ遺伝子を緑膿菌やセラチアより発見。
2. 国内で分離された広域β-ラクタム薬耐性株について、メタロ-β-ラクタマーゼの遺伝子型別の分離状況を調査した。
3. セファマイシンを分解する変異型 AmpC、および GES-4 と命名した新しいクラス Aβ-ラクタマーゼを発見した。
4. 牛や院内感染事例より分離されたセフォタキシム耐性菌について解析を行い、CTX-M-2 型β-ラクタマーゼの産生がその原因である事を確認した。
5. AAC(6')-Iad と命名した新たなアミノグリコシドアセチル化酵素を Acinetobacter より発見した。

【考察】我が国の臨床現場においては、上記したように多種多様な薬剤耐性遺伝子を保有したり新たに獲得した病原細菌が患者材料より分離されている。医療の高度化が推進される中で、それらの耐性菌の存在を念頭におき、日常的な医療行為の中で、抗菌薬の適正使用ならびに院内感染対策が一層推進される必要がある。また、日常の検査業務の中で、それらを分離検出し識別できる能力、技量を高める事が急務となっている。

VanD 型バンコマイシン耐性 *Enterococcus raffinosus*

分担研究者：池 康嘉^{1,2}

研究協力者：野村隆浩¹、谷本弘一²、小澤良之¹、藤本修平¹、丸山英行³、荒川宜親⁴

群馬大院・医・細菌感染制御学¹、同 薬剤耐性菌実験施設²、済生会習志野病院・細菌検査³、国立感染症研究所・細菌第二部⁴

現在までのところ 6 種類 (A、B、C、D、E、F、G) のバンコマイシン耐性遺伝子群が知られている。そのうち臨床上問題になるのは高度バンコマイシン耐性を示す A、B、D 型である。今回、世界的にも数株しか報告のない VanD 型 VRE が初めて日本で分離されたため解析を行った。

分離された菌株は同定の結果 *E. raffinosus* であった。MIC 測定の結果は VCM (1024 μ g/ml)、TEIC(256 μ g/ml)、GM(2048 μ g/ml)、KM(2048 μ g/ml)、SM(1024 μ g/ml)、EM(2048 μ g/ml)、TC(256 μ g/ml)、ABPC(32 μ g/ml) であった。CP には感受性だった。

バンコマイシン耐性の型別を行うために *vanA*、*vanB*、*vanC*、*vanD1*、*vanE* に特異的なプライマーを用いた PCR を行ったが陰性であった。そこで大腸菌の *ddlA*、*ddlB* と VRE の *vanA* 型 ligase の間で保存されているアミノ酸配列から設計されたプライマーを用いて PCR を行ったところ、増幅された DNA 断片を検出することができた。PCR に用いたプライマーで直接シーケンスをしたところ *vanD4* と高い相同性が確認された。VanD4 型の VRE は 1 株報告があり、その塩基配列を参考に作成したプライマーを用いて PCR やシーケンスを行いリガーゼ遺伝子の残りの塩基配列を決定した。その結果、1032 塩基中 2 塩基 (362 番目の G が T に、930 番目の C が T) が変化していた。コードされるアミノ酸は 121 番目の Gly が Val に変化したのみで、2 番目の変異によってアミノ酸は変化しなかった。この結果から、この *E. raffinosus* が VanD4 型の VRE である事がわかった。

接合伝達実験を行ったがバンコマイシン耐性は伝達しなかった。また、プラスミドの分離を試みたが明らかなプラスミドの存在が確認できなかった。このことからバンコマイシン耐性遺伝子群は染色体上に存在している事が考えられた。バンコマイシン耐性遺伝群の発現はバンコマイシンによって誘導される事が知られているので Northern Hybridization を行い VanD 遺伝子の転写を調べたところ。この VanD4 遺伝子群はバンコマイシン非存在下でも発現しており、恒常的に発現している事がわかった。

20030524

以降は、雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
下記の「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」

Escherichia coli producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan.
Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y.
Emerg Infect Dis. 2004 Jan;10(1):69-75.

Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces
extended-spectrum CTX-M-2 type beta-lactamase.
Nagano N, Shibata N, Saitou Y, Nagano Y, Arakawa Y.
J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5530-6.

A new TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase (TEM-91) with
an R164C substitution at the omega-loop confers ceftazidime
resistance.
Kurokawa H, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Kamachi K, Yagi T, Arakawa
Y.
Antimicrob Agents Chemother. 2003 Sep;47(9):2981-3.

Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens*
conferring high-level resistance to aminoglycosides.
Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, Shibayama
K, Kato H, Arakawa Y.
Antimicrob Agents Chemother. 2004 Feb;48(2):491-6.

PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and
integrase carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with
focus on the class 3 integron.
Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H,
Kai K, Arakawa Y.
J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5407-13.

Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*.
Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K,
Yagi T, Kato H, Arakawa Y.
Lancet. 2003 Dec 6;362(9399):1888-93.

Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying Tn1546-like transposons
that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*.
Tomita H, Tanimoto K, Hayakawa S, Morinaga K, Ezaki K, Oshima H, Ike
Y.
J Bacteriol. 2003 Dec;185(23):7024-8.

MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of
Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides.
Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, Lomovskaya
O, Plesiat P.
Antimicrob Agents Chemother. 2003 Apr;47(4):1371-5.

Crystal structure of extended-spectrum beta-lactamase Toho-1:
insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and
substrate specificity expansion.
Ibuka AS, Ishii Y, Galleni M, Ishiguro M, Yamaguchi K, Frere JM,
Matsuzawa H, Sakai H.
Biochemistry. 2003 Sep 16;42(36):10634-43.

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).
Hirose K, Itoh K, Arakawa E, Tamura, K, Watanabe H.
Res. Adv. In Microbiology. 2003;3