

平成 16 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 17 年 3 月

主任研究者 池 康嘉

平成16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
	黒崎 博雅	熊本大学大学院 医学薬学研究部 構造機能物理化学分野	助教授
	後藤 直正	京都薬科大学 薬学部 微生物学	教授
	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	
	麻 興華	同上	
	鄭 波	同上	
	宮本 真美子	同上	
	戸所 大輔	同上	
	長沢 光章	防衛医科大学病院 検査部	
	山根 一和	国立感染症研究所 細菌第二部	
	和知野 純一	同上	
	鈴木 里和	同上	
	柴田 尚宏	同上	
	八木 哲也	同上	

土井 洋平	同上
柴山 恵吾	同上
加藤 はる	同上
甲斐 久美子	同上
横川 滋子	同上
黒川 博史	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
諸角 美由紀	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
小林 玲子	同上
長谷川 恵子	同上
千葉 菜穂子	同上
岩田 敏	(独)東京医療センター小児科
青木 泰子	(独)東京医療センター内科
川名 **	(独)東京国際医療センター内科
砂川 慶介	北里大学医学部感染症学講座
山口 佳宏	熊本大学大学院 医学薬学研究部 構造機能物理化学分野
門野 愛美	京都薬科大学 薬学部 微生物学
尾崎 徹	同上
石井 良和	東邦大学 医学部 微生物学講座
内田 眞佐子	千葉県衛生研究所
依田 清江	同上
廣瀬 健二	国立感染症研究所 細菌第一部
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 ----- 1  
迅速・簡便検出法に関する研究  
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 ----- 19  
荒川 宜親（国立感染症研究所 細菌第二部）
2. ボロン酸化合物を用いた class C  $\beta$ -lactamase(AmpC)型産生菌の ----- 25  
簡易検出法の開発  
荒川 宜親（国立感染症研究所 細菌第二部）
3. CTX-M 型 $\beta$ -ラクタマーゼの分子型別 ----- 34  
荒川 宜親（国立感染症研究所 細菌第二部）
4. 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 ----- 43  
迅速・簡便検出法に関する研究  
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. プラスミドにコードされた AmpC $\beta$ -ラクタマーゼ産生遺伝子の解析 ----- 59  
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 ----- 71  
原因菌の迅速検索法の確立  
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 ----- 83  
黒崎 博雅（熊本大学大学院 医学薬学研究部 構造機能物理化学分野）
8. 緑膿菌の抗菌薬多剤耐性化に機能する排出システムの性状の解析と ----- 91  
簡便検出法の考案  
後藤 直正（京都薬科大学薬学部 微生物学教室）

8. 臨床材料から分離された ESBL 産生および Shiga toxin を産生する <i>Escherichia coli</i> に関する検討 山口 恵三 (東邦大学 医学部 微生物学講座)	95
9. サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学 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)	100
10. リアルタイム PCR を用いたニューキノロン低感受性チフス菌 パラチフス A 菌の迅速検出法の開発 渡辺 治雄 (国立感染症研究所 細菌第一部)	105
11. <i>Staphylococcus aureus</i> PBP のイミペネムに対する反応性 和田 昭仁 (国立感染症研究所 細菌第一部)	111

### 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16年度）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

16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、同 薬剤耐性菌実験施設）

**研究要旨** 【荒川①】 グラム陰性菌にアルベカシン（ABK）高度耐性を賦与する新型の 16S rRNA メチラーゼ生産菌を日本で臨床分離された 2,877 株のグラム陰性菌において調べた。方法は不活化酵素遺伝子検出用 PCR によった。その結果、RmtA 型が 5 株（5 施設）ですべて緑膿菌であった。RmtB 型は 8 株（3 施設）で、それぞれ *E. coli* 2 株、*K. pneumoniae* 4 株、*K. oxytoca* 1 株、*S. marcescens* 1 株であった。ArmA 型が 3 株（3 施設）で、*E. coli*、*Acinetobacter*、*S. marcescens* から分離された。

【荒川②】  $\beta$ -ラクタマーゼは、それらの構造から class A、B、C、D に分離されている。3-アミノフェニルボロン酸を class C  $\beta$ -ラクタマーゼ特異的阻害剤として利用し、DISK 拡散法、MIC 法によりセフォキシム（CTX）（3 世代セフェム）の活性上昇により、class C  $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌を簡便に検出する方法を開発した。

【荒川③】 これまで CTX-M 型  $\beta$ -ラクタマーゼは、それらの構造から 40 型（1～40）が報告されている。2001～2003 年の臨床分離グラム陰性菌 1,456 株について CTX-M 型  $\beta$ -ラクタマーゼの PCR 法により検出を行い、さらに詳しい遺伝子型別を 317 株について行った。その結果、CTX-M-1 グループとして CTX-M-1・CTX-M-3・CTX-M-15・CTX-M-36、CTX-M-2 グループとして CTX-M-2・CTX-M-35、CTX-M-9 グループとして CTX-M-9・CTX-M-14 が存在した。

【池】 *E. faecalis* VanB 型 VRE による院内感染原因菌の中から HGH22 を選び解析した。この

株は接合伝達性バンコマイシン耐性プラスミド pUI22 (107kb) の他に接合伝達性エリスロマイシン耐性プラスミド pTI22 (70kb) を保持していた。pUI22 プラスミドにコードされる VanB 型耐性遺伝子は *vanS<sub>B</sub>-vanY<sub>B</sub>* 領域の塩基配列の解析から *vanB2* 型に分類された。pUI22 はフェロモン反応性プラスミドで合成フェロモン cCF10 に反応するフェロモン反応性接合伝達性プラスミドと考えられた。pUI22 の全塩基配列を決定した。pUI22 は 106,524bp の大きさで、*vanB2* 型耐性遺伝子を含む接合伝達性トランスポゾン Tn1549 (34kb, Van<sup>r</sup>) が挿入したフェロモン反応性プラスミドであった。pTI22 はエリスロマイシン耐性の他に  $\beta$ -Hemolysin/Bacteriocin(Hly/Bac) をコードし、液体培地中で供与菌当たり  $10^{-3} \sim 10^{-4}$  の高頻度に接合伝達した。pTI22 は pAD1 (60kb, Hly/Bac) 類似のフェロモン反応性プラスミドであった。

【井上(岡本)】グラム陰性菌のプラスミド性 AmpC (Class C)  $\beta$ -ラクタマーゼの多量生産機構をそれぞれ異なるプラスミド Class C の遺伝子の遺伝的解析により解明した。pKU601 の場合は、調節遺伝子 *ampR* の点突然変異による。pKU631 の場合は、*ampR* 遺伝子が存在しておらず、*ampC* 遺伝子上流に挿入遺伝子 *ISEcp1* が挿入されており、*ISEcp1* のプロモーターにより *ampC* 転写が増加していることによることが解った。

【生方】呼吸器感染症における原因微生物の網羅的検索法として、その原因となる確率の高い 6 菌種に対する新たな PCR 法のモレキュラー・ビーコンを用いる real-time PCR 法による同時・迅速診断法を開発した。目的菌は①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③A 群溶血性レンサ球菌、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。この方法で、検査材料を直接用いて 1.5 時間で結果が得られた。

【黒崎】メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの有効な阻害剤のスクリーニングを目的とした。Quinoline は IMP-1 および VIM-2 の両方のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを阻害した。Quinoline のメチレン鎖長  $n = 4$  のとき、阻害能が最も高いことがわかった。このことから阻害活性には疎水基とチオール基の間にある程度の長さが必要であることがわかった。PhenylCnSH は強く IMP-1 と VIM-2 を阻害したが、メチレン鎖長  $n$  に強く依存した。

【後藤①】*mexCD-oprJ* オペロンは、キノロン薬、一部の  $\beta$ -ラクタム薬、細胞壁ペプチドグ



リカン構成成分のムロペプチド（ペプチドグリカン単体）等を排出する。*mexCD-oprJ* オペロンのムロペプチド排出機構により、カルバベネム感受性となる機構を解明した。

【後藤②】緑膿菌の多剤排出システム *mexAB-oprM* 高発現株はキノロンを排出することによりキノロン耐性となる。*mexAB-oprM*機能は、MexB 蛋白阻害剤 Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide 塩酸（ジアミン EPI）により阻害され、キノロン感受性となる。これを利用し、緑膿菌に対するレボフロキサシン・ディスクの阻止円の形成に与えるジアミン EPI の影響（ジアミン EPI により阻止円が大きくなる）を調べることにより、*mexAB-oprM* 高発現株を検出する方法を開発した。

【山口（石井）】これまで報告のない基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ（ESBL）を生産する腸管出血性大腸菌 O26 について研究した。O26 はベロ毒素 VT1 生産、セフトキシム（3 世代セフェム）耐性、ESBL（CTX-M-18 型）生産菌であった。この ESBL 遺伝子は接合伝達性プラスミド上に存在していた。

【山本】① *Salmonella Typhimurium* の DT104 の耐性遺伝子獲得機構を解明するために、関連が予想されたトランスポゾン Tn2610 の全塩基配列を決定して DT104 と比較した。Ap、Sm、Su 耐性遺伝子を含む広い領域が共通の祖先から進化してきたことが考えられた。② *Salmonella Typhimurium* の OXA-1 型耐性菌は Ap、Sm、Su、Tc、Cm、Km、Tp の 7 剤耐性である。耐性遺伝子は 150 kbp の Inc-F1 伝達性プラスミドに存在し、プラスミド上にはそれぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する 2 種類の class I インテブロン IntI (*aadB-catB*)、IntI (*oxaI*、*aadAI*) が存在していた。

【渡辺（広瀬）】RT-PCR（リアルタイム-PCR）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 菌の迅速なスクリーニング法を開発した。これらの菌を、リアルタイム PCR 法を用いて検出することを可能にした。

【渡邊（和田）】黄色ブドウ球菌の  $\beta$ -ラクタム剤耐性機構。黄色ブドウ球菌の持つ PBP1 は、MRSA においてもその増殖に必須であることを明らかにした。また、その性質は MRSA のもつ PBP2' とは異なることを示した。

【荒川・池・長沢】わが国において最初に Lancet (1997 6;350(9092):1670-3) に報告され、

世界的に大問題となったバンコマイシンヘテロ耐性 MRSA について、日本の MRSA 臨床分離株の細菌学的・疫学的調査研究、国立感染症研究所におけるサーベイランス事業およびこれまでのバンコマイシンヘテロ耐性 MRSA 関連論文の細菌学的、生物学的検証、考察に基づき、最初の報告に対する反論と問題点を Lancet (2004 24;363(9418):1401) に掲載した。

### 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  
黒崎 博雅 熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授  
後藤 直正 京都薬科大学薬学部 教授  
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

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、及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、及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。わが国

### 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

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。平成

12年～14年度の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。平成15年度からの研究において、新たな新型の临床上重要な耐性菌も発見され、研究が継続されている。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。

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事が可能となる。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、それらを検出したり識別する新しい検査・検出法の開発が期待で

きる。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うことにより、それらの耐性菌防御の基礎データを得ることができ。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

各分担研究報告書に記載する。

## C. 研究結果

【荒川①】アミノグリコシド (AG) のアルベカシン (ABK) は、これまで発見されている細菌の AG 修飾酵素では不活化されにくい。荒川等により、緑膿菌から発見された新型 AG 不活酵素 RmtA および RmtB は、ABK の他、ほとんどすべての AG 系薬剤を不活化する。これらの新型不活化酵素生産菌は AG 薬剤に高度耐性となる。これらの新型酵素は AG 生産放射菌が自らの 16S rRNA をメチル化し AG 耐性となり放射菌自らを AG から防護する酵素 (16S rRNA メチラーゼ) と類似酵素で、酵素遺伝子 *rmtA*、*rmtB* はそれぞれ接合伝達性プラスミド上に存在する。グラム陰性菌にアルベカシン (ABK) 高度耐性を賦与する新型の 16S rRNA メチラ

一ゼ生産菌を日本で臨床分離された 2,877 株のグラム陰性菌において調べた。方法は不活化酵素遺伝子検出用 PCR によった。その結果、RmtA 型が 5 株 (5 施設) ですべて緑膿菌であった。RmtB 型は 8 株 (3 施設) で、それぞれ *E. coli* 2 株、*K. pneumoniae* 4 株、*K. oxytoca* 1 株、*S. marcescens* 1 株であった。ArmA 型が 3 株 (3 施設) で、*E. coli*、*Acinetobacter*、*S. marcescens* から分離された。

【荒川②】 $\beta$ -ラクタマーゼは、それらの構造から class A、B、C、D に分離されている。これまで class A の基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL)、class B のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの簡便検出方法を開発してきた。今回 class C  $\beta$ -ラクタマーゼの簡便検出方法を開発した。ボロン酸化合物の 3-アミノフェニルボロン酸が class C  $\beta$ -ラクタマーゼの特異的な阻害剤であることを発見した。3-アミノフェニルボロン酸を class C  $\beta$ -ラクタマーゼ特異的阻害剤として利用し、DISK 拡散法、MIC 法によりフフォキシム (CTX) (3 世代セフェム) の活性上昇により、class C  $\beta$ -ラクタマーゼ生産菌を簡便に検出する方法を開発した。

【荒川③】基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ

(ESBL)の中で、CTX-M型  $\beta$ -ラクタマーゼは、グラム陰性菌に抗菌域を持つセフトキシム (CTX) 等の 3 世代セフェムを分解するが、3 世代の中で CAZ (セフトチナム) は、ほとんど分解しない。これまで CTX-M 型  $\beta$ -ラクタマーゼは、それらの構造から 40 型 (1~40) が報告されている。2001~2003 年の臨床分離グラム陰性菌 1,456 株について CTX-M 型  $\beta$ -ラクタマーゼの PCR 法により検出を行い、さらに詳しい遺伝子型別を 317 株について行った。その結果、CTX-M-1 グループとして CTX-M-1・CTX-M-3・CTX-M-15・CTX-M-36、CTX-M-2 グループとして CTX-M-2・CTX-M-35、CTX-M-9 グループとして CTX-M-9・CTX-M-14 の型が存在した。

【池】日本で 1999 年に初めて起きた VRE 院内感染症事例が報告された。報告では 4 人の入院患者の喀痰、尿から VRE が分離された。その後、入院患者の便を検査したところ 16 人が VRE を保菌していた。分離された VRE は全て VanB 型 *E. faecalis* 株であり、PFGE による解析から 1 株を除き全て類似の染色体 DNA パターンを示し、同一の株による院内感染が考えられた。これらの株はバンコマイシン耐性プラスミドを保持していた。染色体パターン

の異なる 1 株は染色体上に耐性遺伝子が存在した。今回この病院で分離された VRE 19 株の詳しい解析を行った。耐性遺伝子が染色体に存在する 1 株を除き、全てのバンコマイシン耐性が液体培地中で供与菌当たり  $10^{-4} \sim 10^{-6}$  の高頻度で接合伝達した。代表的な一株 HGH22 を選び解析した。この株は接合伝達性バンコマイシン耐性プラスミド pUI22 (107kp) の他に接合伝達性エリスロマイシン耐性プラスミド pTI22 (70kb) を保持していた。pUI22 プラスミドにコードされる VanB 型耐性遺伝子は *vanS<sub>B</sub>-vanY<sub>B</sub>* 領域の塩基配列の解析から *vanB2* 型に分類された。Southern hybridization の解析から pUI22 はフェロモン反応性プラスミドに保存されている接合伝達制御領域を持ち、さらに合成フェロモン cCF10 により凝集が誘導されたことから pCF10 (54kb, Tet<sup>r</sup>) 類似のフェロモン反応性接合伝達性プラスミドと考えられた。pUI22 の全塩基配列を決定した。pUI22 は 106,524bp の大きさで、*vanB2* 型耐性遺伝子を含む接合伝達性トランスポゾン Tn1549 (34kb, Van<sup>r</sup>) が挿入したフェロモン反応性プラスミドであった。pTI22 はエリスロマイシン耐性の他に  $\beta$ -Hemolysin/Bacteriocin(Hly/Bac) をコー

ドし、液体培地中で供与菌当たり  $10^{-3} \sim 10^{-4}$  の高頻度に接合伝達した。合成フェロモン cAD1 によって凝集が誘導されたことから pTI22 は pAD1 (60kb, Hly/Bac) 類似のフェロモン反応性プラスミドであった。

【井上(岡本)】グラム陰性菌の染色体性クラス C  $\beta$ -ラクタマーゼ生産遺伝子は *ampR-ampC* オペロン構造である *ampR* は調節遺伝子、*ampC* は  $\beta$ -ラクタマーゼ (構造) 遺伝子である。*ampR-ampC* 遺伝子はプラスミド上に存在することもある。大腸菌から分離されたプラスミド pKU601、肺炎桿菌から分離された pKU631 は、それぞれ *ampC* 遺伝子をコードしている。それぞれのプラスミドを保持する大腸菌実験株は AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼを多量生産する。グラム陰性菌のプラスミド性 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼの多量生産の機構をそれぞれのプラスミドの遺伝的解析により解明した。pKU601 の場合は、調節遺伝子 *ampR* の点突然変異による。pKU631 の場合は、*ampR* 遺伝子が欠失しており、*ampC* 遺伝子上流に挿入遺伝子 *ISEcpl* が挿入されており、*ISEcpl* のプロモーターにより *ampC* 転写が増加していることが解った。

【生方】呼吸器感染症における原因微生物

の網羅的検索法として、その原因となる確率の高い6菌種に対する新たなPCR法のモレキュラー・ビーコンを用いるreal-time PCR法による同時・迅速診断法を開発した。この方法で、検査材料を直接用いて1.5時間で結果が得られた。市中呼吸器感染症における起炎菌検索の対象としたのは、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(*M. pneumoniae*)、⑤レジオネラ菌(*L. pneumophila*)、および⑥クラミジア菌(*C. pneumoniae*)の6菌種である。PCR用の各プライマーは主にそれぞれの16S rRNA遺伝子上に設計した。肺炎球菌のみは*lytA*遺伝子に設計した。6菌種は反応チューブあたり1-10CFUあたりのDNAが存在すれば、陽性と判定された。この成績は、検体採取用のシードスワブ(滅菌綿棒)の先に $10^3$  CFUの目的菌DNAが付着していれば、PCR陽性と判定される感度であった。

**【黒崎】**メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの有効な阻害剤のスクリーニングを目的とした。二つの化合物群、2- $\omega$ -phenylalkyl-3-mercaptopropionic acid (PhenylCnSH (n = 1-4)) と *N*-[(7-chloro-quinolin-4-ylamino)-alkyl]-

3-mercapto-propionamide (QuinolineCnSH (n = 2-6))、ここでnはアルキル鎖の炭素数を示す)のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ(IMP-1およびVIM-2)に対する阻害活性について調べた。これらの阻害剤は異なったメチレン鎖によって結合した疎水性基並びにチオール基を有している。PhenylCnSH (n = 1-4)はIMP-1およびVIM-2の両方に対し阻害することがわかった。中でもPhenylC4SHは最も強くIMP-1 ( $IC_{50} = 1.2 \mu M$ )並びにVIM-2 ( $IC_{50} = 1.1 \mu M$ )を阻害した。QuinolineCnSHでは、メチレン鎖の数を変化させたときQuinolineC4SHが最も強くIMP-1 ( $IC_{50} = 2.5 \mu M$ )並びにVIM-2 ( $IC_{50} = 2.4 \mu M$ )を阻害することがわかった。また、IMP-1存在下QuinolineCnSHの蛍光スペクトルを測定した結果、蛍光の消光が観測されたことからメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの蛍光検出試薬としては有効であると推測された。

**【後藤①】***mexCD-oprJ*オペロンのムロペプチド排出機能により、カルバペネム感受性となる機構を解明した。緑膿菌の染色体上の多剤排出システムオペロンは、12種類存在するとされている。その中で、主な抗菌薬排出システムは*mexA-mexB-oprM*、*mexC-mexD-oprJ*、*mexX-mexY-oprM*である。*mexCD-oprJ*オペロ

ンは、キノロン薬、一部の  $\beta$ -ラクタム薬、細胞壁ペプチドグリカン構成成分のムロペプチド(ペプチドグリカン単体)等を排出する。一方、染色体性  $\beta$ -ラクタム剤耐性遺伝子 AmpC 遺伝子は、抑制蛋白 AmpR により抑制される。 $\beta$ -ラクタム剤存在下で細菌内ムロペプチドが増加する、ムロペプチド/AmpR により AmpC 遺伝子が誘導され、 $\beta$ -ラクタマーゼ生産がおこる。しかしながら、緑膿菌 *mexCD-oprJ* オペロンが存在するとき、ムロペプチドが細菌細胞外に排出される結果、ムロペプチド/AmpR による AmpC 遺伝子の誘導がおこらないために  $\beta$ -ラクタマーゼが生産されない。その結果、 $\beta$ -ラクタム剤イミペネム(カルバペネム)感受性となることがわかった。

【後藤②】緑膿菌の多剤排出システム *mexAB-oprM* 高発現株はキノロンを排出することによりキノロン耐性となる。*mexAB-oprM* 機能は、MexB 蛋白阻害剤 Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide 塩酸(ジアミン EPI)により阻害され、キノロン感受性となる。これを利用し、緑膿菌に対するレボフロキサシン・ディスクの阻止円の形成に与えるジアミン EPI の影響(ジアミン EPI により阻止円が大きくなる)を調べることにより、

*mexAB-oprM* 高発現株を検出する方法を開発した。

【山口(石井)】これまで報告のない基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ(ESBL)を生産する腸管出血性大腸菌 026 についての研究。Vero 毒素生産性腸管出血性大腸菌の感染症分離菌の多くは 0157H7 で、次に 026 が分離される。これらの菌で ESBL 生産菌の報告はない。水溶性下痢症小児から分離された大腸菌 026 は、ベロ毒素 VT1、生産セフトキシム(3世代セフェム)耐性、ESBL(CTX-M-18型)生産菌であった。この ESBL 遺伝子は接合伝達性プラスミド上に存在していた。

【山本】食中毒散発事例より分離された多剤耐性 *Salmonella enterica serovar Typhimurium* の薬剤耐性遺伝子領域の構造解析を行った。ペニシリン(Ap)耐性を賦与する  $\beta$ -ラクタマーゼの種類(型)により PSE-1 型 15 株(65%)、OXA-1 型 15 株(22%)、その他 3 株(13%)に分類された。1) *Salmonella Typhimurium* の OXA-1 型耐性菌は Ap、Sm、Su、Tc、Cm、Km、Tp の 7 剤耐性である。耐性遺伝子は 150 kbp の Inc-F1 伝達性プラスミドに存在した。プラスミドにはそれぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する、2 種類の class I イン

テブロン IntI(*aadB-catB*)、IntI(*oxaI, aadAI*) が存在していた。2) サルモネラの中で、多剤耐性菌は *Salmonella Typhimurium* DT104 (definitive type104) が最も分離頻度が高い。DT104 の Ap、Sm、Tc、Cm 各耐性遺伝子は *Salmonella* Genomic Island I (SGII) 内に存在するこの Ap 耐性は PSE-1 型  $\beta$ -ラクタマーゼによるものである。これとは別に、大腸菌のある種のプラスミド上に PSE-1 をコードするトランスポゾン Tn2610 (23,883 bp) が存在する。DT104 の SGI1 と Tn2610 遺伝子塩基配列により構造解析を行い、相互の構造類似性を解析した。

**【渡邊(広瀬)】** RT-PCR 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 菌の迅速なスクリーニング法を開発した。腸チフス、パラチフス治療の第一選択薬はニューキノロン薬である。これらの菌のニューキノロン耐性菌が分離されている。耐性機構はニューキノロンの作用物質ジャイレースの遺伝子 *gyrA* の 83 番および 87 番目の変異である。これらの変異を、リアルタイム PCR 法を用いて検出することを可能にした。

**【和田】** 黄色ブドウ球菌の  $\beta$ -ラクタム剤耐性機構。黄色ブドウ球菌の持つ PBP1 は、MRSA

においてもその増殖に必須であることを明らかにした。また、その性質は、MRSA の持つ PBP2' とは異なることを示した。黄色ブドウ球菌に  $\beta$ -ラクタム剤を作用させることにより、形態および PBP の細胞膜上の極在等を顕微鏡下で解析したその結果、黄色ブドウ球菌の持つ PBP1 は、MRSA においてもその増殖に必須であることを明らかにした。また、その性質は MRSA の持つ PBP2' とは異なることを示した。

**【荒川・池・長沢】** バンコマイシンヘテロ耐性 MRSA (Lancet. 1997 6;350(9092):1670-3) の問題について、日本全国 278 医療施設の臨床分離 MRSA 約 7,000 株についての細菌学的調査研究を行い、国立感染症研究所の薬剤耐性菌に関するサーベイランス事業における情報処理を行った。また、バンコマイシンヘテロ耐性 MRSA およびバンコマイシン低感受性 MRSA に関連するこれまでの世界の主な論文の考察等を行った。これらの結果に基づき、最初に報告されたようなバンコマイシンヘテロ耐性 MRSA が疫学的、細菌生物学的に存在することは非常にあり得ないことであることの内容論文が Lancet (2004 24;363(9418):1401) に掲載されたものである。



## D. 考察

これまで報告されているアミノグリコシド系抗生物質不活化酵素は、アミノグリコシド系の薬剤をリン酸基、アデニル基、アセチル基等により付加修飾することにより、不活化する。アルベカシンはこれらの不活化酵素により、不活化されにくい薬剤である。荒川等が発見したアルベカシンに高度耐性(1,024 $\mu$ g/ml以上)を示す緑膿菌は、アルベカシンを含め、ほとんどすべてのアミノグリコシドに耐性であった。これらの菌から耐性を賦与する新型の酵素が2種類発見され、それぞれ RmtA、RmtB と名づけられた。酵素遺伝子 *rmtA*、*rmtB* はグラム陰性菌の高頻度接合伝達性プラスミドにコードされており、アミノグリコシド高度耐性が接合伝達により各種グラム陰性菌に拡散する可能性がある。これらの酵素は 16SrRNA メチラーゼ (メチル化酵素) であり、アミノグリコシドの標的である rRNA をメチル化することにより、アミノグリコシドが rRNA に結合し不活化することを阻害することにより耐性となる。アミノグリコシドを生産する放線菌は、自己の 16SrRNA をメチル化して保護するために 16SrRNA メチラーゼを生産する。RmtA、RmtB はこれらの放線菌が生

産する 16SrRNA メチラーゼと類似の酵素で、薬剤耐性の起源が抗生物質生産菌であることの証拠として生物学的にも重要な発見である [荒川]。日本の臨床分離グラム陰性菌を調査研究した結果、各種のグラム陰性菌で RmtA、RmtB、および ArmA (ヨーロッパで発見された 16SrRNA メチラーゼ) 生産菌が発見されたことは、これらの耐性菌が各種のグラム陰性菌に拡がる可能性と、これらの菌により院内感染発症の危険性を示唆するものである [荒川]。

Class A および Class B、 $\beta$ -ラクタマーゼの簡便検出方法はこれまで [荒川等] により開発されてきた。荒川等によるボロン酸化合物を用いた新たな Class C  $\beta$ -ラクタマーゼ簡便検出方法は、DISK 拡散方法を用いて容易に検出可能で材料は安価であり、検出感度も高く、臨床現場で利用可能な検出方法である [荒川]。

基質拡散型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 生産菌の疫学的調査研究は、現時点での日本の ESBL の遺伝子型別が解り、わが国の ESBL のレファランスとして重要な研究である [荒川]。

日本においてはバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の分離は欧米において比較して少ない。欧米においては VRE の中で *E. faecium* VanA

型 VRE の分離頻度が高く、VRE の 90%以上を占める。VanB VRE の分離は少ない。VanB 型遺伝子は比較的大きな分子サイズの接合伝達性トランスポゾン Tn1549 (34 kb) にコードされ、腸球菌の染色体に存在することが一般的である。日本の院内感染起因菌から分離された *E. faecalis* VanB は、*E. faecalis* であること、Tn1549 (34 kb、VanB) 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することにおいて稀な例であり、腸球菌間および医療現場で拡散しやすい性質を持った VRE である。また、この VRE は日本の VanB 型のレファランスの一つとして重要である【池】。

$\beta$ -ラクタマーゼは 100 種以上の報告があるが、酵素の基本的な構造から A~D の 4 種類に分類できる。そのうち Class C  $\beta$ -ラクタマーゼは *E. coli* を含め、多くのグラム陰性菌の染色体にその遺伝子がコードされている。Class C  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子がプラスミド上に存在することもある。Class C  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子は ampR (調節遺伝子) /ampC (構造遺伝子) で構成されるオペロン構造をしているが、プラスミド上の Class C  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子は一般的には ampC 遺伝子の

み存在することが多い。プラスミド性の Class C  $\beta$ -ラクタマーゼはその生産量が多く、多剤  $\beta$ -ラクタム耐性を示す。それぞれ異なる臨床分離グラム陰性菌から分離された、それぞれの Class C  $\beta$ -ラクタマーゼ生産プラスミドの Class C  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子構造解析を行った。それぞれの遺伝子構造は異なる遺伝子構造で、その発現機構も異なっていた。これらの研究はプラスミド性 Class C  $\beta$ -ラクタマーゼ生産機構とレファランスのための基礎的研究である【井上(岡本)】。

主要な呼吸器感染症起因菌は、生方等の研究で対象とした肺炎球菌を含め 6 種の菌がある。臨床材料からこれらの菌を RT-PCR 法を用いて迅速に検出する方法の開発は化学療法の間からも有用な研究である。これらの検出方法は RT-PCR のための設備上の必要性もあるが、臨床分離起因菌検出の立場から今後利用され得る研究である【生方】。

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼは、すべての  $\beta$ -ラクタム剤を加水分解する。その阻害剤は  $\beta$ -ラクタム剤の抗菌活性を保つために医療上主要な物質である。物理化学的方法を用いて PhenyI<sub>n</sub>SH 化合物と Quinoline<sub>n</sub>SH 化合物の 2 種類の化合物群のスクリーニングを

行い、阻害活性の強い化合物を検出した。そしてその阻害活性の物理化学的構造解析を X 線結晶構造解析により明らかにした。この研究は  $\beta$ -ラクタム剤を有効に活用するために医療において有用な研究である[黒崎]。

緑膿菌の多剤排出システムは、緑膿菌が菌体内の各種の物質を排出する機構で、それらの排出物質の中には抗菌剤も含まれる。この機構は緑膿菌が各種の抗菌剤に低感受性であることの一因となる。多剤排出システムの中で主要なシステムの一つ *mecCD-oprJ* オペロンの排出機構により、カルバペネム感受性となる機構の解析を行った。この研究結果は *mecCD-oprJ* オペロンの働き、 $\beta$ -ラクタム剤の作用による細胞壁ペプチドグリカンのムロペプチド (ペプチドグリカン単体) の増加と排出、Class C  $\beta$ -ラクタマーゼ生産遺伝子の発現等、緑膿菌内の各種の遺伝子発現と、それらの形質の発現の結果、カルバペネム感受性となることを解明したものである。この研究は一つの形質発現がそれぞれ異なる機能を持つ遺伝子群の形質発現の結果であることを明らかにしたもので、排出機構が関連する新たな発見である[後藤]。

緑膿菌の野生株は、各種の多剤排出システ

ムを発現していることが推測される。しかしながら、それらの排出システムの発現を検出することは簡単ではなく、遺伝学的手法等を用いなくてはならない。重要な排出システムである *mecAB-oprM* の発現を、*mexB* 阻害剤 (ジアミン EPI) を用いて薬剤 (ニューキノロン) 排出機能が阻害される結果、ニューキノロンにより感受性となることを利用した寒天平板での簡便検出方法は、有用な検出方法である[後藤]。

Vero 毒素生産腸管出血性大腸菌起因菌は、*E. coli* O157:H7 が多く、次いで O26 多い。これらの菌は一般的には抗菌剤が効果を示し、拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 生産菌の報告もない。臨床分離された *E. coli* O26:H11 は ESBL 生産菌で、その遺伝子は接合伝達性プラスミド上に存在していた。このことは *E. coli* O26:H11 が ESBL 生産グラム陰性菌から ESBL 遺伝子を獲得したことが推測される。この発見は今後の腸管出血性大腸菌感染症に対する抗菌薬投与方法にも影響を与えるものである[山口(石井)]。

食中毒患者分離 *Salmonella Typhimurium* の多剤薬剤耐性遺伝子の遺伝学的構造解析の研究は、この菌の多剤薬剤耐性獲得の遺伝学的

進化の過程を解明すること、およびこの菌の  
多剤薬剤耐性菌のレファランス形成のための  
研究である【山本】。

腸チフス・パラチフス菌の野生型はニュー  
キノロン剤に超感受性で、耐性菌（低感受性）  
のこれらの薬剤の MIC は数  $\mu\text{g/ml}$  である。そ  
してこれらの低感受性菌は、これらの菌によ  
る全身感染症においてニューキノロン剤の治  
療に抵抗性を示す。このレベルの低感受性菌  
は通常の検査室での MIC 検査方法では検出が  
困難である。RT-PCR 法を用いたこれらの菌の  
ニューキノロン低感受性検出方法は、このレ  
ベルの低感受性菌の検出を可能にしたもので  
ある。この方法は RT-PCR を必要とする設備上  
の制約もあるが、検査センター等あるいは設  
備のある病院レベルにおいて利用可能な検査  
方法である【渡辺(広瀬)】。

黄色ブドウ球菌、MRSA 等の細胞壁合成酵素  
(PBPs) の機能は充分解っていない。これら  
の菌に  $\beta$ -ラクタム剤を作用させることによ  
り、これらの菌の形態、PBPs の細胞膜での極  
在を顕微鏡下で観察し、その PBPs の機能を解  
析した。 $\beta$ -ラクタム剤の作用機序、および  
それらに対する耐性機構を解析するための研  
究である【和田】。

バンコマイシン (VCM) は MRSA に対する特  
効薬で、バンコマイシンの MRSA に対する MIC  
は  $1\mu\text{g/ml}$  をピークに  $2\mu\text{g/ml}$  の範囲内に存  
在する。そのため、その耐性が上昇すること  
は MRSA 感染症治療に重大な危機が生ずる。わ  
が国で最初に報告された (Lancet, 1997  
6;350(9092):1670-3) ヘテロバンコマイシン  
耐性菌は VCM MIC  $8\mu\text{g/ml}$  の VCM 低感受性株  
を高頻度に生ずる特殊な株と定義され、その  
株が日本の医療機関の臨床分離株に高頻度に  
存在するとの報告であった。そのため世界中  
で大問題となり、その菌の分離および分離方  
法に関し臨床検査領域およびその治療方法に  
おいて臨床現場で混乱と多大な浪費を生じた。  
最初の報告の VCM ヘテロ耐性 MRSA が現時点に  
おいて疫学的にも生物学的にも存在しないこ  
とを論文内容が Lancet (2004  
24;363(9418):1401) に掲載されたものである  
【荒川・池・長沢】。

## F. 結論

(1) 新型の薬剤耐性機構の発見：グラム  
陰性菌緑膿菌から発見された新型アミノグリ  
コシド不活化酵素はほとんどすべてのアミノ  
グリコシドを不活化する。この酵素の臨床分