

平成 15 - 17 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)

総合研究報告書

平成 18 年 4 月

主任研究者 池 康 嘉

平成17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 微生物学教室	教授
	山口 恵三	東邦大学 医学部 微生物・感染症学講座	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)	長沢 光章	防衛医科大学校病院 検査部	
	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	
	和知野 純一	国立感染症研究所 細菌第二部	
	山根 一和	同上	
	鈴木 里和	同上	
	柴田 尚宏	同上	
	木村 幸司	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	
	前山 佳彦	同上	
	石川 直人	同上	
	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	
小川 倫洋	京都薬科大学 薬学部 微生物学教室		
奥野 陽亮	同上		

Alba Jimena	東邦大学 医学部 微生物・感染症学講座
木村総一郎	同上
石井 良和	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

厚生労働科学研究費補助金 総合・総括研究報告書目次

I. 総合研究報告書 (平成 15年度～平成17年度)		
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		
池 康嘉	-----	1
II. 総括研究報告書 (平成 17 年度)		
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		
池 康嘉	-----	25
III. 分担研究報告書 (平成 17 年度)		
荒川 宜親	新規プラスミド媒介性 16S rRNA Methyltransferase, RmtC の解析	39
荒川 宜親	第4世代セファロスポリンを分解する CMY-19 型 $\beta$ -ラクタマーゼの解析	47
池 康嘉	臨床分離メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の 抗菌剤感受性	58
池 康嘉	日本で最初に分離された VanD 型 VRE <i>E. raffinosus</i> GV5 の VanD 型耐性遺伝子群と <i>ddl</i> 遺伝子に関する 解析	67
井上 松久	プラスミド性セフェム薬耐性菌の検出と耐性発現に 関わる挿入配列の解析	74
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	81
黒崎 博雅	-カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究- X 線結晶構造解析を用いた metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-1)の Asp120(81)の役割の検討	87
黒崎 博雅	-カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究- 3-(3-Mercaptopropionylsulfanyl)propionic acid pentafluorophenyl ester による metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-1)の非可逆的阻害	95
後藤 直正	緑膿菌のマルチコンポーネント型 RND 型排出システム の機能解析	112
山口 恵三	クラス A に属するカルバペネマーゼ、KPC-3、の酵素 学的特徴	116
山本 友子	(1) サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学 (2) 臨床分離フルオロキノロン高度耐性菌の耐性機構	120

渡邊 治雄	1. リアルタイム PCR を用いた血液中からのチフス菌・ パラチフス A 菌の迅速検出法の開発	-----	126
	2. $\beta$ -ラクタム剤に対する耐性度が低下した変異株を 生じる肺炎球菌の解析		
IV. 班会議抄録	-----		137
V. 研究成果の刊行に関する一覧表および別刷	-----		165

## II. 総括研究報告書（平成17年度）

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症事業)

17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細菌感染制御学、同 薬剤耐性菌実験施設)

研究要旨

【荒川】 アミノグリコシド超高度耐性を付与する 16S rRNA methyltransferase 遺伝子が腸内細菌科やブドウ糖非醗酵群に属するグラム陰性桿菌から発見した。現在まで *rmtA*, *rmtB*, *armA* の 3 種類の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子が同定されている。今回 *P. mirabilis* ARS68 株から新型の methyltransferase 遺伝子 *rmtC* を発見した。

【池】 患者より分離された VRE、*Enterococcus raffinosus* GV5 は日本で最初の VanD 型 VRE で、VanD 型 VRE として最初の *E. raffinosus* である。VanD 型耐性遺伝子群の構造と発現調節を解析した。GV5 は VanD4 型で、耐性発現が恒常的であった。

【池・荒川】 2004 年に全国 95 病院より分離された MRSA1,096 株の抗 MRSA 薬、バンコマイシン(VCM)、テイコプラニン(TEIC)、アルベカシン(ARBK)に対する疫学調査を行った。VCM は 0.5 µg/ml~2 µg/ml、TEIC 0.25 µg/ml~4 µg/ml、ARBK は 0.13 µg/ml~8 µg/ml であった。

【井上】 グラム陰性桿菌のセフェム薬高度耐性化のメカニズムとして、プラスミドにコードされた基質拡張型 β-ラクタマーゼ(ESBLs)、AmpC β-ラクタマーゼ(pAmpC)およびメタロ β-ラクタマーゼ(Metallo)生産菌 2004.4~2005.5 分離グラム陰性菌の疫学から、調査研究を行った。セフェム薬高度耐性を賦与する β-ラクタマーゼの疫学的実態を明らかにした。

【生方】 呼吸器感染症の主要な起炎菌、肺炎球菌、インフルエンザ菌、A 群溶血レンザ球菌、マイコプラズマ、クラミジア、レジオネラの 6 菌種を molecular beacon(MB) probe を用いる real-time PCR 法により2時間程度で検査材料から検出できる方法を開発した。

【黒崎】 日本で発見されたメタロ-β-ラクタマーゼ(IMP-1)の加水分解機構の解明を目的とし、ほとんどすべてのメタロ-β-ラクタマーゼの活性中心に保存されている 120(81)\*位の Asp を Ala と Glu に置換した部位特異的変異体(D120(81)A, D120(81)E)を調製し、120(81)位の Asp の役割について解析し、この部位が触媒活性にとって必須であることを明らかにした。

【後藤】 グラム陰性菌の染色体には、抗菌薬や消毒薬などの異物や細胞内代謝産物の排出に

働いているマルチコンポーネント型 RND 型排出システムがコードされている。本年度研究では、1) RND 型排出システムの分布および 2) 病原性発現への関与の研究を行った。

緑膿菌の Mex 排出システムは抗菌薬耐性のみならず、本菌の Quorum sensing 機構や、病原因子の産生にも関与すること、緑膿菌の 12 種類の Mex システムのすべてが抗菌薬耐性に働くのではなく、それぞれが固有の機能をもち、緑膿菌の病原性の発揮などに機能していること、Mex 排出システムの機能の阻害によって緑膿菌の病原性の制御が行える可能性を明らかにした。

【山口】カルバペネム系薬は  $\beta$  ラクタマーゼに安定な抗菌薬である。カルバペネム分解酵素として、クラス B 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼが代表的な酵素で、その生産菌は日本で問題となっている。欧米においては、クラス A、D に属するカルバペネム分解酵素生産菌が分離されている。米国で分離されたクラス A の新型のカルバペネム分解酵素 KPC-3 産生 *K. pneumoniae* の酵素学的特徴を明らかにした。

【山本】2000 年 4 月～2001 年 3 月の期間に臨床分離されたグラム陰性菌 399 株 *E. coli*(133 株)、*K. pneumoniae* (100 株)、*P. aeruginosa* (118 株)、*Citrobacter koseri* (13 株)、*S. marcescens* (21 株)、*P. mirabilis* (14 株) のフルオキノロン耐性を調べた。また、高度耐性機構の遺伝学的解析を調べた。

【和田】肺炎球菌の  $\beta$ -ラクタム剤に対する耐性は細胞壁を合成するペニシリン結合蛋白 (PBP) の変異による小児の咽頭から分離されたペニシリン耐性肺炎球菌から分離された、ペニシリン耐性の低下した変異株を用いて耐性機構の解析をおこなった。

【渡邊(広瀬)】リアルタイム PCR を用いた血液中からのチフス菌・パラチフス A の迅速検出法の開発を行った。この方法は各種グラム陰性菌に特異性が高く、対して、少量の検査材料を用いて直接検出可能な方法である。

#### 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 群馬大学大学院医学系研究科 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

渡邊 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、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、それらを検出したリ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。

過去2年間の研究において各種の新型の薬剤耐性菌も発見され、また新型の薬剤耐性菌の簡便検出方法も開発されてきた。本研究班の研究事業の最終年度となる本年度(平成17

年度)の研究においては、これまでに発見されてきた新型の薬剤耐性菌の研究の発展的研究、新たに開発された迅速簡便検出方法の応用、および新たに発見された新型の薬剤耐性菌の疫学的実態調査等の研究を目的とする。

## 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】 *P. mirabilis* ARS68 株より抽出した plasmid で *E. coli* DH5 $\alpha$  にアミノグリコシド高度耐性に形質転換された。アミノグリコシド耐性を付与する遺伝子は plasmid 上に存在する可能性が示唆された。アミノグリコシド耐性遺伝子をクローン化し、塩基配列を決定した。新規 16S rRNA methyltransferase 遺伝子(*rmtC*)が同定された。His-tag を付加した RmtC 蛋白は *E. coli* DH5 $\alpha$  より抽出した 16S rRNA をメチル化した。*rmtC* は transposase gene (*tnpA*) を含む *ISEcpI*-element の下流に存在し、*rmtC* の転移はこの *ISEcpI*-element に支配されていた。また、*rmtC* の転写開始点は *ISEcpI*-element 内に存在した。

【池】 GV5 の耐性遺伝子群は VanD4 型である。既報の D4 株との比較でアミノ酸置換が VanS<sub>D</sub> で 2 カ所、VanH<sub>D</sub> に 1 カ所、VanD に 1 カ所、VanY<sub>D</sub> には 1 塩基の挿入が見つかった。VanR<sub>D</sub>、VanX<sub>D</sub> には変化はなかった。*vanS<sub>D</sub>*、*vanY<sub>D</sub>*、*vanD* 遺伝子をプローブとして northern hybridization の結果、バンコマイシンの有無にかかわらず耐性遺伝子群は転写された。その

結果、GV5 の耐性遺伝子群の発現は恒常的であった。VanS<sub>D</sub> は VanR<sub>D</sub> のリン酸化(活性化)と脱リン酸化(不活化)機能を持つ GV5 の VanS<sub>D</sub> は VanS<sub>D</sub> の脱リン酸化領域に 2 ヶ所のアミノ置換があった。*ddl* 遺伝子(D-Ala:D-Ala ligase)染色体に 2 ヶ所のアミノ置換が存在したこの変異により、*ddl* 遺伝子が不活化されている可能性が推測された。

【池・荒川】 2004 年に全国 95 病院より分離された MRSA1,096 株の抗 MRSA 薬、バンコマイシン(VCM)、テイコプラニン(TEIC)、アルベカシン(ARBK)に対する疫学調査を行った。VCM は 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 2  $\mu\text{g/ml}$ 、TEIC 0.25  $\mu\text{g/ml}$  ~ 4  $\mu\text{g/ml}$ 、ARBK は 0.13  $\mu\text{g/ml}$  ~ 8  $\mu\text{g/ml}$  であった。

【井上】 過去 1 年間に分離された *E. coli*、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca* および *P. mirabilis* におけるセフェム薬耐性菌の検出率は、それぞれ 4.4, 1.1, 5.3 および 38.5% であり、*P. mirabilis* におけるセフェム薬耐性化が顕著であった。これらセフェム薬耐性菌から検出されたプラスミド性の ESBLs、pAmpC および Metallo の割合は、*E. coli* ではそれぞれ 25, 5.2 および 2.9% であり、51.7% は染色体性 AmpC の多量産生株であった。同様に、*K. pneumoniae* では ESBLs、pAmpC および Metallo の割合がそれぞれ 41.2, 17.6 および 23.5% であった。一方、*K. oxytoca* では ESBLs の割合は 20% であったが、残りの 80% は染色体性 OXY の多量産生株であった。さらに、*P. mirabilis* ではセフェム薬耐性株のすべてが ESBL 産生菌であった。ESBL 産生菌について、

その酵素型を明らかにした。また、CTX-MESBL 生産遺伝子の調節領域の挿入変異を明らかにした。

【生方】呼吸器感染症の主要な起炎菌、肺炎球菌、インフルエンザ菌、A 群溶血レンザ球菌、マイコプラズマ、クラミジア、レジオネラの 6 菌種を molecular beacon (MB) probe を対象とした。まず、それらに特異的な MB プローブとプライマーを設計した。肺炎球菌は *lytA* 遺伝子、レジオネラは *mip* 遺伝子、他の 4 菌種は 16S rRNA 遺伝子上に MB probe とプライマーを設計した。臨床検査材料からの DNA 抽出には Extragen II kit を用い、PCR には Mx3000P 機器を使用した。DNA の抽出から結果を得るまでの所要時間は 2 時間以内である。

【黒崎】メタロ-β-ラクタマーゼの活性中心に保存されている 120(81)\*位の Asp を Ala と Glu に置換した部位特異的変異体(D120(81)A, D120(81)E)を調製し、120(81)位の Asp の役割について検討した。野生型の IMP-1 の Asp120(81)は D120(81)A および D120(81)E 変異体の定常状態における速度論的研究において  $k_{cat}$  が減少し  $K_m$  が増大したことから触媒活性、基質認識に重要であることがわかった。D120(81)E 変異体の X 線結晶構造解析に成功した(図1右)。その活性中心構造は第一の Zn(II)イオンに 3 つの His が配位し、第 2 の Zn(II)イオンへは His, Cys, Glu の 1 つの酸素原子が配位しており、さらに Glu のもう一つの酸素原子が 2 つの Zn(II)イオンを架橋して配位していた。野生型 IMP-1 の X 線結晶構造解析結果(図1左)との比較から Asp120(81)の第二

の Zn(II)イオンに配位していないカルボキシル基の酸素原子は、2 つの Zn(II)イオンを架橋している OH<sub>2</sub> または OH<sup>-</sup> と水素結合することが、触媒活性にとって必須であることがわかった。アミノ酸番号は BBL numbering に従い番号付けた。( )の中は matured 酵素におけるアミノ酸番号を示す。

【後藤】データベース上のゲノム配列情報をもとに緑膿菌およびセラチア菌の RND 型排出システムのホモログ解析を行ったところ、自然環境で生育する細菌での分布が多いことが分かった。

抗菌薬感受性:  $\Delta mexAB-oprM$  や  $\Delta mexXY$  は多くの抗菌薬感受性を上昇させた(多剤耐性の消失)が、他の Mex オペロンの欠失ではそのような多剤耐性の消失は観察されなかった。

運動性 (swimming, swarming, twitching): 病原因子として機能する運動性を調べたところ、それぞれの運動性に影響を与える Mex オペロンが同定された。

病原因子産生:  $\Delta mexEF-oprN$ 、 $\Delta PA3523-PA3522-PA3521$ 、 $\Delta PA4374-PA4375$  によってアルカリプロテアーゼとエラスターゼの産生が顕著に減少した。また、acyl homoserinelactone 合成酵素である *lasI* および *rhII* 遺伝子の発現に伴う菌体外の acyl homoserinelactone 産生が消失した。また  $\Delta mexXY$  によっては acyl homoserinelactone の受容体である *lasR* と *rhIR* 遺伝子の発現が低下し、アルカリプロテアーゼとエラスターゼの産生が半減した。これらの結果は、Mex システ

ムが Quorum sensing 関連の遺伝子の発現に影響を与えることを示している。

カイコ致死活性: MDCK 細胞モノレイヤの透過性を減少させた  $\Delta PA4374$ - $PA4375$  や  $\Delta czcABC$  はカイコ致死活性を減少させることが分かった。

【山口(石井)】 米国で分離された新型のカルバペネム分解酵素 KPC-3 産生 *K. pneumoniae* の酵素が最も高い加水分解効率を示した基質は、nitrocefin と cephalothin であり、 $k_{cat}/K_m$  値は夫々  $2.6 \mu M^{-1}s^{-1}$  および  $3.5 \mu M^{-1}s^{-1}$  の値を示した。Cephalothin の  $k_{cat}$  および  $K_m$  値は夫々  $264 s^{-1}$  および  $261 \mu M$  と極めて高値を示した。Imipenem と meropenem は KPC-3 に対する好適基質であり、 $k_{cat}/K_m$  値は夫々  $1.9 \mu M^{-1}s^{-1}$  および  $1.4 \mu M^{-1}s^{-1}$  であった。全体的に KPC-3 は KPC-1 および KPC-2 の酵素学的パラメータと類似の値を示した。しかし、詳細にそのパラメータを見てみると、KPC-3 が他の KPC-型酵素と比較して、ceftazidime に対する  $k_{cat}$  値が高いこと、cefoxitin の  $K_m$  値が高いことなどいくつかの相違点を認めた。KPC-3 は KPC-2 と 1 アミノ酸残基 (H272Y) を異にするのみである。本アミノ酸残基は、基質のカルボン酸と相互作用すると考えられる、KPC-型酵素の 209 番目のアルギニンに影響を与える可能性が示唆された。

【山本】 2000 年 4 月~2001 年 3 月に分離された臨床由来グラム陰性桿菌のフルオキノロン耐性を調べた。フルオロキノロン耐性グラム陰性菌の比率は、*Escherichia coli* で 6 % (8 株/133 株)、*Klebsiella pneumoniae* で 2 % (2 株

/100 株)、*Pseudomonas aeruginosa* で 32% (38 株/118 株) *Citrobacter koseri* で 84 % (11 株/13 株)、*Serratia marcescens* で 23 % (5 株/21 株)、*Proteus mirabilis* で 86% (12 株/14 株) であった *P. mirabilis* のフルオロキノロン耐性機構については報告例が少ない。*P. mirabilis* のフルオロキノロン高度耐性に *gyrA*, *parC*, *parE* は GyrB の変異が寄与する可能性が示唆された。

【和田】 ペニシリン耐性肺炎桿菌分離株を血液寒天で培養したところ、扁平で内部が陥凹したタイプのコロニー(SP111)に混じり、厚みがあり中央部の陥凹がはっきりしないコロニー(SP112)を生じた。各々を血液寒天で継代すると、SP111 からは再び SP112 タイプのコロニーが約 1/100 の割合で形成されたが、SP112 からは SP111 タイプのコロニーが現れることはなかった。SP111 と SP112 では、 $\beta$ -ラクタム剤に対する感受性に 2-4 倍の差が見られた(SP111 [PCG, 8; ABPC, 16]; SP112 [PCG, 2; ABPC, 8])。PBPs の生産量には両株において差はなかった。また、細胞壁触媒酵素遺伝子 *lytA* にも変異はなかった。

【渡邊(広瀬)】 腸チフス・パラチフス A の診断までの時間を短縮するために、リアルタイム PCR を用いて、患者血液中から直接チフス菌・パラチフス A 菌の存在を証明し、診断する方法を確立した。この方法を用いて、敗血症を起こすチフス・パラチフス以外の菌として、O2, O9 H-d, H-a をもつサルモネラ、エルシニア、ビブリオ、アエロモナス、大腸菌、赤痢菌に対する PCR の特異性を調べたが、これらの菌を

チフス・パラチフスとする偽陽性は見られなかった。様々な菌量のパラチフス A を生理食塩水と血液にくわえ、PCR の感度を調べたところ、100  $\mu$ l の生理食塩水中では 17.5 CFU、同じく 100  $\mu$ l の血液中には 175 CFU の菌量まで検出可能であった。

#### D. 考察

【荒川】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。ほとんどすべてのアミノグリコシドに耐性を賦与する新型の酵素が2種類発見され、緑膿菌、セラチア菌から発見されたものが、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。本年度の研究では、プロテウス菌 (*Proteus mirabilis*) から RmtA、RmtB とは異なる新たな 16S rRNA メチラーゼ (RmtC) を発見し、その遺伝子構造を明らかにし、酵素を複製した。これらの発見は、各種の 16S rRNA メチラーゼが存在し、広くグラム陰性菌に広がっていることを示唆するものである。

【池】新型のバンコマイシン耐性菌 VanD 型は世界で数例発見されているのみである。今回、わが国で VanD 型 (VanD4 型) 菌を *E. raffinosus* から発見した。この菌は耐性が恒常的に発現し、また染色耐性のペプチドグリカン

生産のための ligase が欠損していることが示唆された。VanD 型菌が各種の腸球菌から分離することを示した研究である。

【井上(岡本)】臨床分離グラム陰性菌の  $\beta$ -ラクタム剤耐性菌の分離頻度の現状を調査した結果は、 $\beta$ -ラクタム薬に対するこれらの菌の感受性を反映するもので、臨床上意義ある研究である。

【生方】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。

【黒崎】メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの活性領域の分子生物学的およびX線構造解析の研究は、この酵素の生物物理学的研究成果のものならず、この酵素生産の検出方法、阻害剤開発に有効である。

【後藤】緑膿菌の Mex 排出システムは抗菌薬耐性のみならず、本菌の Quorum sensing 機構や、病原性因子発現にも関与すること、緑膿菌の12種類の Mex システムのすべてが抗菌薬耐性に働くのではなく、それぞれが固有の機能を持ち、緑膿菌の病原性の発揮などに機能していること、Mex 排出システムの機能の阻害によって緑膿菌の病原性の制御が行える可能性を示唆する研究では、この結果は排出システムの新たな機能として重要である。

【山口(石井)】米国で分離された ClassA に

属する新型のカルバペネム分解酵素 KPC-3 型の解析は、今後日本のこの種の酵素生産菌のレファレンスとなる。

【山本】 各種グラム陰性菌のニューキノロン耐性菌の疫学的調査およびその耐性機構の解析は、ニューキノロン耐性のレファレンスとなり得る。

【和田】 黄色ブドウ球菌、MRSA 等の細胞壁合成酵素 (PBP) の機能解析および肺炎球菌の  $\beta$ -ラクタム剤耐性機構等の解析は充分解っていない。グラム陽性菌に対する  $\beta$ -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として有用である。

【渡邊 (広瀬)】 腸チフス、パラチフスのリアルタイム PCR を用いた検出方法は、短時間で少量の検査材料 (血漿) を用いて検査診断可能で、特異性の高い検出方法で臨床において有用な検出方法である。

【池・荒川】 臨床分離 MRSA の抗菌剤感受性の疫学調査研究は、MRSA の薬剤感受性のレファレンスとなる研究である。

## E. 結論

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。

変形菌 (*P. mirabilis*) から新型 RmtC の発見は、超高度アミノ糖耐性を賦与する各種の 16SrRNA methyltransferase による耐性が、広くグラム陰性菌に拡がっていることを示すもので、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】。

MRSA の全国の臨床分離株の抗 MRSA 薬に対する抗菌活性の調査研究結果【荒川・池】、臨床分離各種グラム陰性桿菌の  $\beta$ -ラクタム薬に対する感受性疫学調査研究【井上】、各種グラム陰性桿菌に対するニューキノロン薬の感受性疫学調査研究【山本】、新型のカルバペネム分解酵素 KPC-3 型の酵素学的研究【山口 (石井)】は、各種抗菌薬に対する各種緑膿菌の感受性および耐性 (耐性機構) のレファレンスとなる研究である。

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの活性領域の分子生物学的および生物物理学的研究は、この酵素の検出方法および阻害剤開発のための行政的に役立つ重要な基礎的研究である【黒崎】。

重要呼吸器感染症起因菌の RT-PCR を用いた迅速検出方法の開発【生方】、血液中からのチフス菌・パラチフス A の迅速検出方法の開発は、それぞれ少量の検査材料から直接、感染起因菌を短時間に検出可能にするものである【渡邊 (広瀬)】。

新型薬剤耐性菌の細菌学的基礎研究。*P. mirabilis* アミノ糖耐性の RmtC の研究【荒川】、*E. raffinosus* の VanD4 の研究【池】、緑膿菌排出システムの新たな生物学的機能研究【後藤】、カルバペネム分解酵素 KPC-3 型酵素の研究【山口 (石井)】、ペニシリン耐性およびその感受性変異株の研究【和田】等の研究は、新型薬剤耐性菌の基礎的研究で、今後これらの耐性菌のレファレンスと

なり得る。

## F. 研究成果

### 発表論文

荒川 宜親

1. Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata N, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Horizontal transfer of blaCMY-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(2):534-41 (2006)
2. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(1):178-84 (2006)
3. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 43(6):2551-8 (2005)

4. Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis.* 11(6):951-3 (2005)
5. Yamaguchi Y, Kuroki T, Yasuzawa H, Higashi T, Jin W, Kawanami A, Yamagata Y, Arakawa Y, Goto M, Kurosaki H. Probing the role of Asp-120(81) of metallo-beta-lactamase (IMP-1) by site-directed mutagenesis, kinetic studies, and X-ray crystallography. *J Biol Chem.* 27;280(21):20824-32 (2005)

池 康嘉

1. Inoue T, Tomita H, Ike Y. Bac 32, a Novel Bacteriocin Widely isseminated among Clinical Isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(4):1202-12 (2006).
2. Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata N, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Horizontal transfer of blaCMY-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(2):534-41 (2006)
3. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase,

- RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(1):178–84 (2006)
4. Tomita H, Ike Y. Genetic analysis of transfer-related regions of the vancomycin resistance *Enterococcus* conjugative plasmid pHTbeta: identification of *oriT* and a putative relaxase gene. *J Bacteriol.* 187(22):7727–37 (2005)
  5. Takeuchi K, Tomita H, Fujimoto S, Kudo M, Kuwano H, Ike Y. Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits. *FEMS Microbiol Lett.* 15;243(2):347–54 (2005)
  6. Tanimoto K, Nomura T, Hamatani H, Xiao YH, Ike Y. A vancomycin-dependent VanA-type *Enterococcus faecalis* strain isolated in Japan from chicken imported from China. *Lett Appl Microbiol.* 41(2):157–62 (2005)
- 井上 松久
1. Nagano N, Nagano Y, Nakano R, Okamoto R, M. Inoue M. Genetic diversity of the C protein  $\beta$ -antigen gene and its upstream regions within clonally related groups of type Ia and Ib group B streptococci. *Microbiology.* 152 (2006) *in press.*
  2. Kaneko K, Sato Y, Tokunaga S, Tamaki S, Okamoto R, Inoue M. AmpC  $\beta$ -lactamase-mediated cefpodoxime-resistant *Escherichia coli* isolated from faecal samples of healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother.* 57; 369–71 (2006)
  3. Kaneko K, Okamoto R, Nakano R, Kawakami S, Inoue M. Gene mutations responsible for overexpression of AmpC  $\beta$ -lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol.* 43: 2955–8 (2005)
  4. Maeda K, Ida T, Sanbongi Y, Suzuki T, Fukushima T, Kurazono M, Yonezawa M, Ubukata K, Inoue M. Comparison of activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* with recombinant penicillin-binding protein genes from a penicillin-resistant strain. *J Infect Chemotherapy.* 11: 107–11. (2005)
  5. Tsuji A, Kobayashi I, Oguri T, Inoue M, Yabuuchi E, Goto S. An epidemiological study of the susceptibility and frequency of multiple-drug-resistant strains of *P. aeruginosa* isolates at medical institutes nationwide in Japan. *J Infect Chemother.* 11:64–70 (2005)
  6. Hosaka Y, Irinoda K, Nakano R, Tanabe S, Koizumi W, Saigenji K, Inoue M. Use



of the Restriction Enzyme *EcoRI* for Pulsed-Field Gel Electrophoretic Analysis of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiology*. 43:931-2 (2005)

7. Okitsu N, Kaieda S, Yano H, Nakano R, Hosaka Y, Okamoto R, Kobayashi T, Inoue M. Characterization of *ermB* Gene Transposition by *Tn1545* and *Tn917* in Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *J Clin Microbiology*. 43: 168-73 (2005)

#### 生方 公子

1. Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, Kobayashi R, Chiba N, Tajima T, Ubukata K. Simultaneous detection of pathogens in community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J Clinical Microb. in press*
2. Morozumi M, Ito A, Murayama SY, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, Kawamura N, Kuroki H, Nakayama E, Tajima T, Ubukata K. Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 1-6 (2006)
3. 生方 公子. 薬剤耐性に関する遺伝子解析. *日本臨床* 63:413-417(2005)
4. 諸角 美由紀, 生方 公子. 呼吸器感染

症の起因菌迅速同時検出法. *臨床病理レビュー特集号* 135:1-6(2005)

5. 諸角 美由紀, 生方 公子. リアルタイムPCRを用いたマイコプラズマの検出. *化学療法の領域(医薬ジャーナル)* 21(3):51-6(2005)
6. Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Medical Microb.* 54:1037-41(2005)
7. Chiba N, Kobayashi R, Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, Tajima T, Iwata S, Ubukata K. Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein and macrolide resistance genes, and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children. *J. Antimicrob Chemother.* 156:756-60(2005)
8. Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R, Inoue N, Iwata S, Kuroki H, Kawamura N, Nakayama E, Tajima T, Shimizu K, Ubukata K. Emergence of macrolides-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(6): 2302-6(2005)

黒崎 博雅

1. Kurosaki H, Yamaguchi Y, Higashi T, Soga K, Matsueda S, Yumoto H, Misumi S, Yamagata Y, Arakawa Y, Goto M. Irreversible Inhibition of Metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-1) by 3-(3-Mercaptopropionylsulfanyl)propionic Acid *Pentafluorophenyl Ester*. *Angew Chem, Int Ed Engl.* 44; 3861-3864 (2005)
2. Yamaguchi Y, Kuroki T, Yasuzawa H, Higashi T, Jin W, Kawanami A, Yamagata Y, Arakawa Y, Goto M, Kurosaki H. Probing the Role of Asp120(81) of Metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-1) by Site-directed Mutagenesis, Kinetic Studies, and X-Ray Crystallography. *J Biol Chem.* 280; 20824-20832 (2005)
3. Niga T, Ito H, Oyamada Y, Yamagishi J, Kadono M, Gotoh N, Nishino T, Inoue M. Cooperation between Alternation of the DNA gyrase genes and Overexpression of MexB and MexX Confers High-level Fluoroquinolone Resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.Immunol.* 49:443-446 (2005)
4. 後藤直正. 特集「Quorum-sensing機構研究の新展開-呼吸器感染症を中心に-」緑膿菌のエフラックスシステムとQuorum-sensing機構. *分子呼吸器病* 9: 22-25 (2005)
5. 後藤直正. 特集「病原細菌と外界を結ぶチャンネル-薬剤排出ポンプと病原因子分泌装置」細菌のマルチコンポーネント型 RND 異物排出システム群の機能. *蛋白質核酸酵素* 50: 6-12 (2005)

#### 後藤 直正

1. Yoneda K, Chikumi H, Murata T, Gotoh N, Yamamoto H, Fujiwara H, Nishino T, Shimizu E. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Efflux Pumps by Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 243:125-131 (2005)
2. Chuanchuen R, Murata T, Gotoh N, Schweizer HP. Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2133-2136 (2005)

#### 山口 恵三

1. Ishii Y, Alba J, Maehara C, et al. Identification of atypical phenotypic *Staphylococcus aureus* clinical isolates with three automated identification systems. *J Med Microbiol.* (2006) *in press*
2. Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES and Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:4760-2 (2005)

3. Ishii Y, Alba J, Kimura S, Shiroto K and Yamaguchi K. Evaluation of antimicrobial activity of  $\beta$ -lactam antibiotics using Etest against clinical isolates from 60 medical centres in Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 25:296-301 (2005)
4. Ishii Y, Kimura S, Alba J, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern. *J Clin Microbiol*. 43:1072-5 (2005)
5. Kimura S, Alba J, Shiroto K, et al. Clonal diversity of metallo- $\beta$ -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol*. 43:458-61 (2005)
6. Shiroto K, Ishii Y, Kimura S, et al. Metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1 in *Providencia rettgeri* from two different hospitals in Japan. *J Med Microbiol*. 54:1065-70 (2005)
7. Kimura S, Ishii Y and Yamaguchi K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM- type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 53:241-4 (2005)

Organization of Tn2610 containing two transposition modules. *Antimicrob. Agents Chemother*. 50:4 (2006) *in press*

#### 渡邊 治雄

1. Hirose K, Terajima J, Izumiya H, Tamura K, Takai N, Watanabe H. Antimicrobial susceptibility of *Shigella sonnei* in Japan and molecular analysis of *S. sonnei* isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolone. *Antimicrobiol Agent Chemother*. 49: 1203-5 (2005)
2. Adachi T, Sagara H, Hirose K, Watanabe H. Fluoroquinolone resistant *Salmonella Paratyphi A*. *Emerg Infect Diseases*. 11: 172-4 (2005)

ガイドライン、マニュアルは該当無し

#### G. 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

#### 山本 友子

1. Takaya A, Watanabe M, Yamamoto T.

### Ⅲ. 分担研究報告書（平成17年度）