

使用菌株

2004年に全国95病院より収集したMRSA 2,231株(1施設最大25株)より1施設あたり11株前後となるように無作為に1,096株を選びバンコマイシン、テイコプラニン、アルベカシンについて発育最小阻止濃度(MIC)測定に用いた。

抗生物質の最小発育阻止濃度の測定

ミューラーヒントンS寒天培地(栄研)及び感受性ブイオン培地(栄研)を用い、CLSIの方法に従い寒天平板希釈法により行った。

C. 結果

バンコマイシン(Vcm)、テイコプラニン(Tei)に対するMIC

バンコマイシンは0.5 μ g/mlから2 μ g/ml、テイコプラニンは0.25 μ g/mlから4 μ g/mlの範囲にすべての株のMICが含まれた。テイコプラニンの範囲がバンコマイシンの範囲より広いがいずれの薬剤にも耐性菌は見いだされなかった。(表1、図1a, b)

アルベカシン(ABK)に対するMIC

感受性が若干低下した株(8 μ g/ml)が10株存在したが、それ以外の株(99%)では感受性であった。(表1、図2a, b)

D. 考察・結論

1997年に我々が行ったMRSAの全国調査の結果(3)と同様にMICが4 μ g/ml以上となるバンコマイシンに耐性のMRSAは存在しなかった事から、バンコマイシンやテイコプラニンなどのグリコペプチドに対する感受性は変

化していないと考えられる。アルベカシンについては耐性領域の下限にあたる濃度(8 μ g/ml)での耐性菌がわずかに(1%)見いだされているが低度の耐性菌はアルベカシンが使用され始めた90年代前半から時折分離されたもので(5)、他の報告(4)(1.9%)同様低い分離頻度であった。

現在までのところMRSAの感受性が高いとされている薬剤は依然としてMRSAに有効であるが、前述したとおり黄色ブドウ球菌の外来性遺伝子取り込み能力は極めて高く、いつそれら薬剤に対する耐性菌が出現してもおかしくない状況である。よって、これまでどおり医療施設での抗生物質の使用に関して十分なコントロールを継続させるとともに、MRSAの薬剤に対する感受性調査を今後も続けて行く必要がある。s

参考文献

- (1) CDC. 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin A United States, MMWR 51:565-7.
- (2) Ishino K, Ishikawa J, Ikeda Y, Hotta K. 2004. Characterization of a bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme with novel substrate specificity and its gene from a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high arbekacin resistance. J Antibiot. 57:679-86.
- (3) Ike Y, Arakawa Y, Ma X, Tatewaki K, Nagasawa M, Tomita H, Tanimoto K, Fujimoto S. 2001. Nationwide survey shows that

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals.

J Clin Microbiol. 39:4445-51.

(4) 小崎繁昭 2005「臨床分離株の薬剤感受性成績調査および薬剤感受性検査の変動因子と精度管理に関する研究」厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「薬剤耐性菌の発生動向のネットワークに関する研究」平成16年度 総括研究報告書

(5) Kondo S, Tamura A, Gomi S, Ikeda Y, Takeuchi T, Mitsuhashi S. 1993 Structures of enzymatically modified products of arbekacin by methicillin-resistant. *Staphylococcus aureus*. J Antibiot. 46:310-5.

表1. 各抗菌剤に対する最小発育阻止濃度と分離頻度(%)

薬剤\薬剤濃度(μg/ml)	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥128	総検体数
Vcm	0	0	0.7	55.7	43.6	0	0	0	0	0	0	0	1096
Tei	0	0.8	6.8	42.1	39.5	10.8	0	0	0	0	0	0	1096
ABK	0.3	16.9	50.8	25.7	3.7	1.6	0.9	0	0	0	0	0	1096

表1. 各抗菌剤に対する最小発育阻止濃度と分離株数

薬剤\薬剤濃度(μg/ml)	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥128	総検体数
Vcm	0	0	8(0.7)*	611(55.7)	477(43.6)	0	0	0	0	0	0	0	1096(100%)
Tei	0	9(0.8)	75(6.8)	461(42.1)	433(39.5)	118(10.8)	0	0	0	0	0	0	1096(100%)
ABK	3(0.3)	185(16.9)	557(50.8)	282(25.7)	41(3.7)	18(1.6)	10(0.9)	0	0	0	0	0	1096(100%)

*括弧内は分離頻度(%)

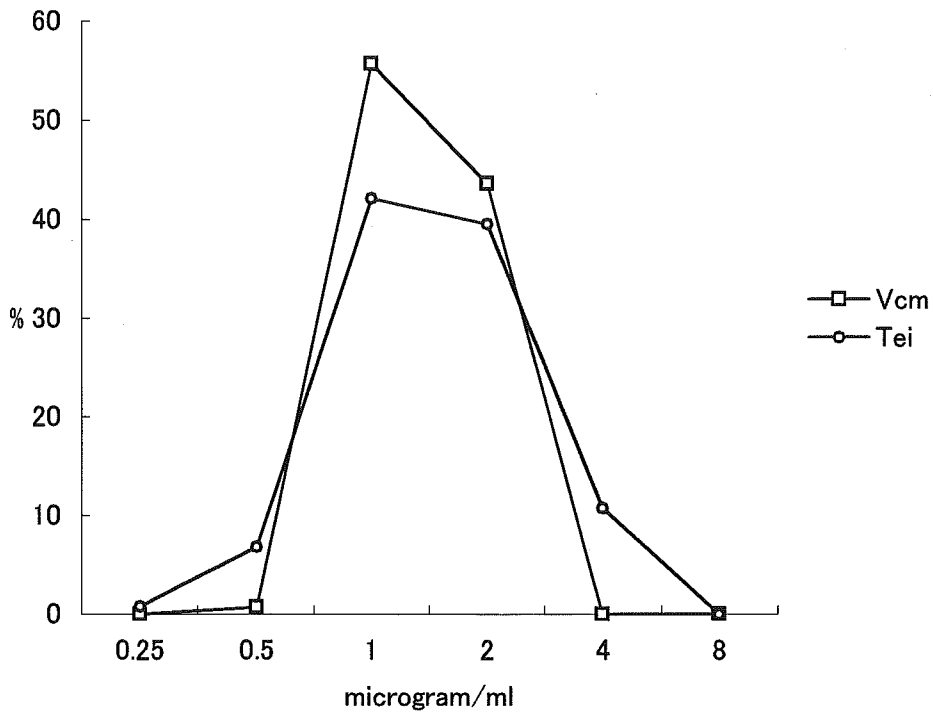


図 1a. Vcm と Tei に対する MIC と分離頻度

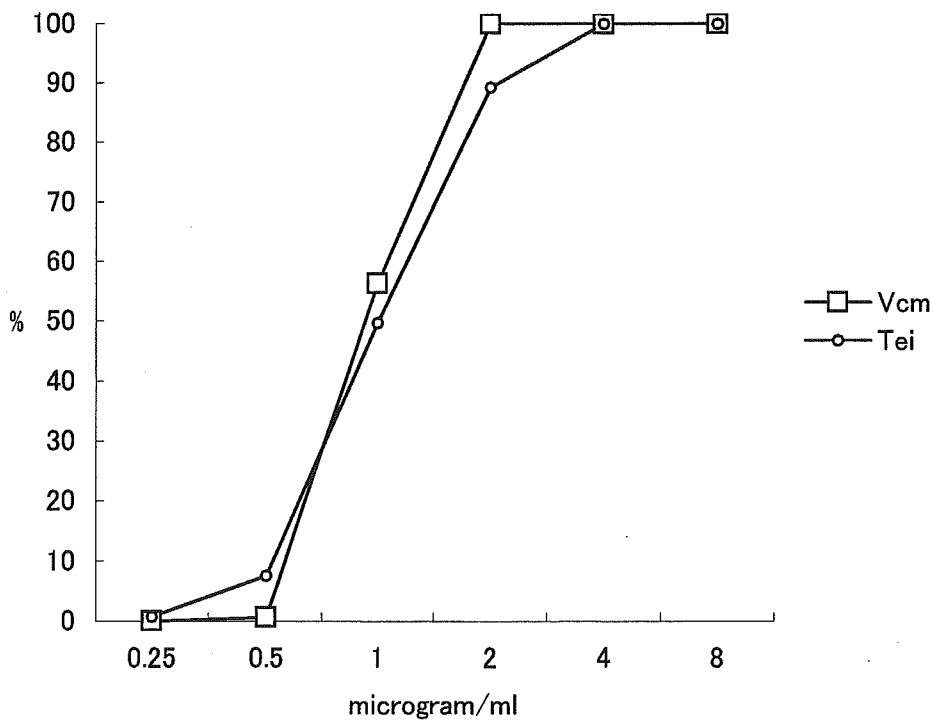


図 1b. Vcm と Tei に対する MIC と累積頻度

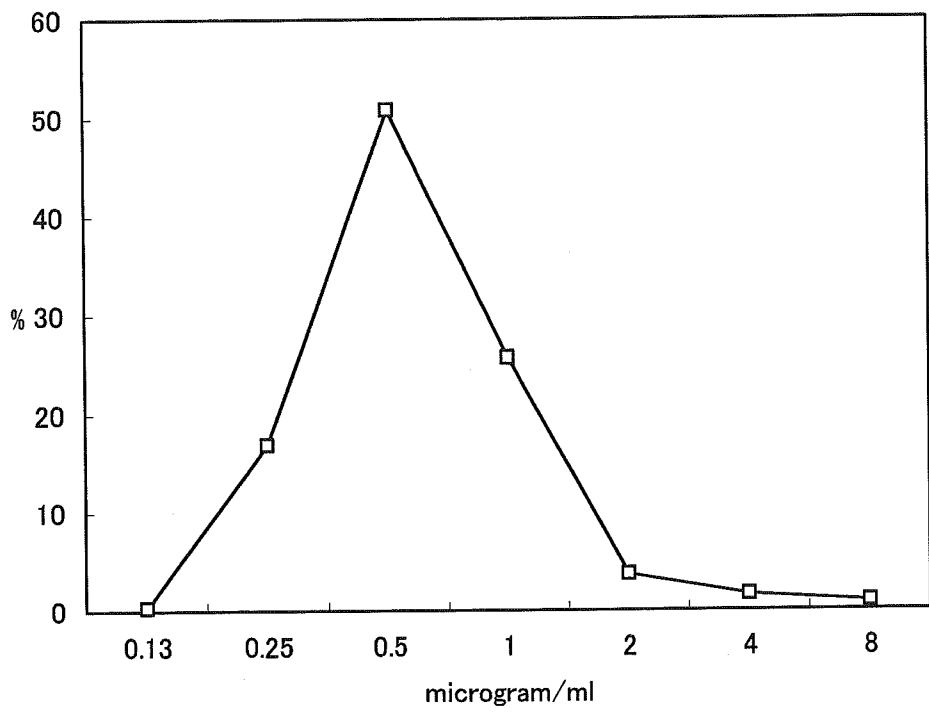


図 2a. ABK に対する MIC と分離頻度

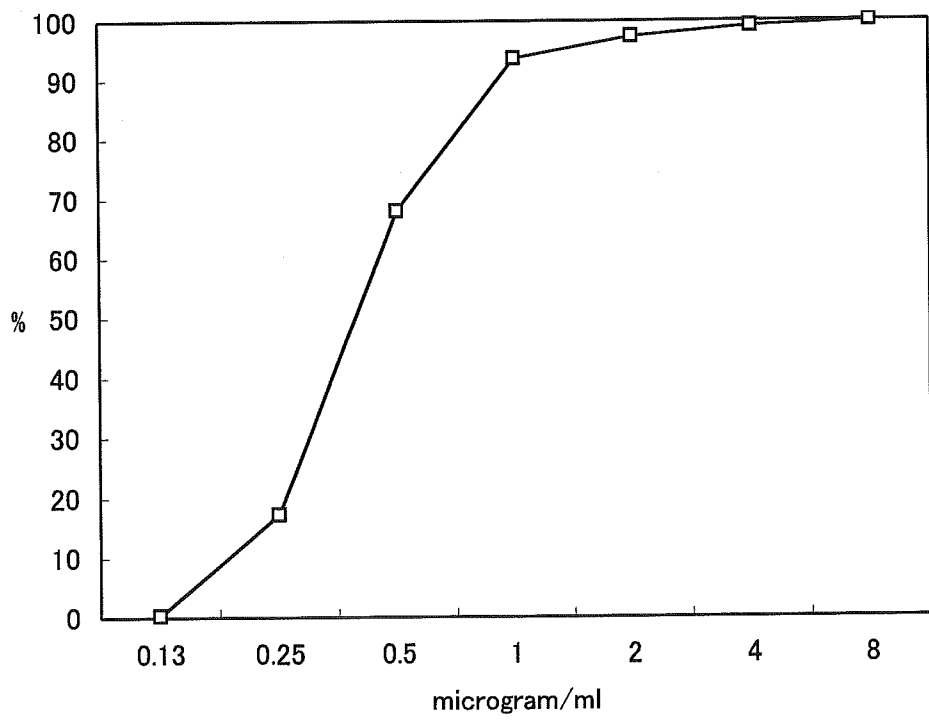


図 2b. ABK に対する MIC と累積頻度

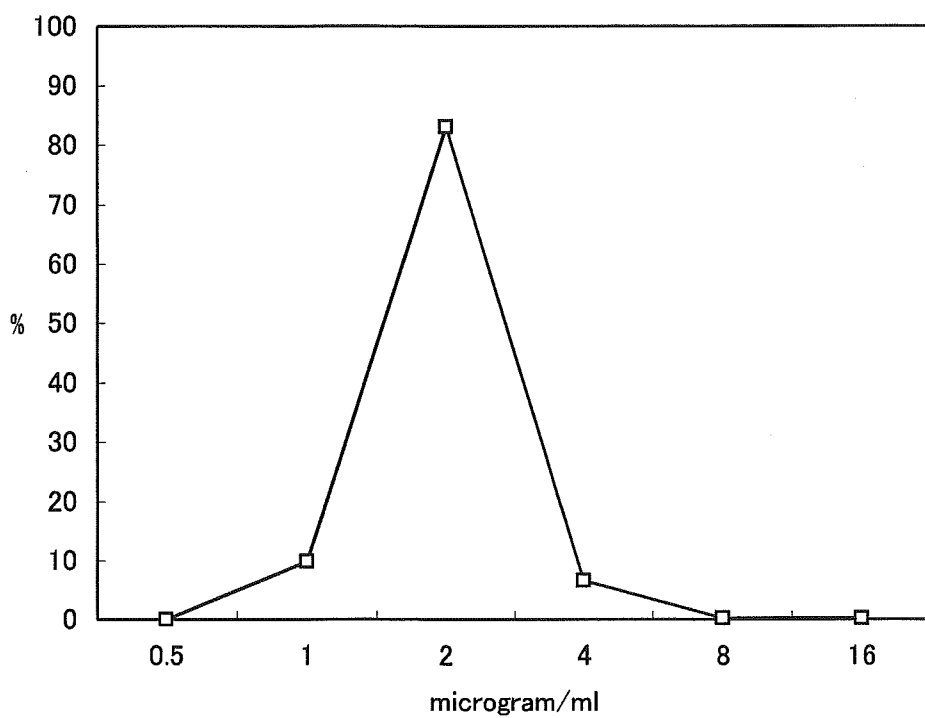


図 3a. ST 合剤に対する MIC と分離頻度

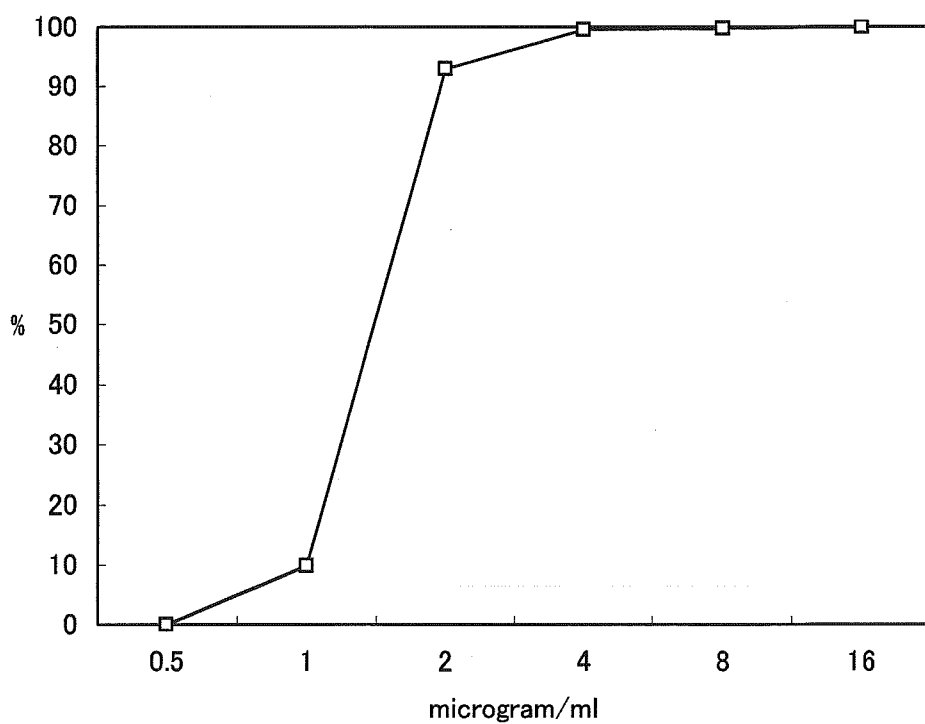


図 3b. ST 合剤に対する MIC と累積頻度

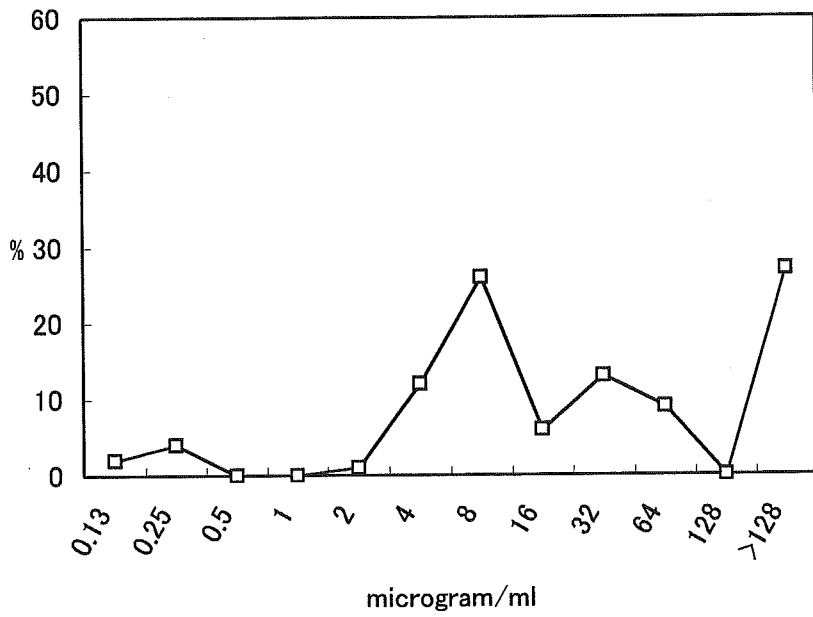


図 4a. LVFX 合剤に対する MIC と分離頻度

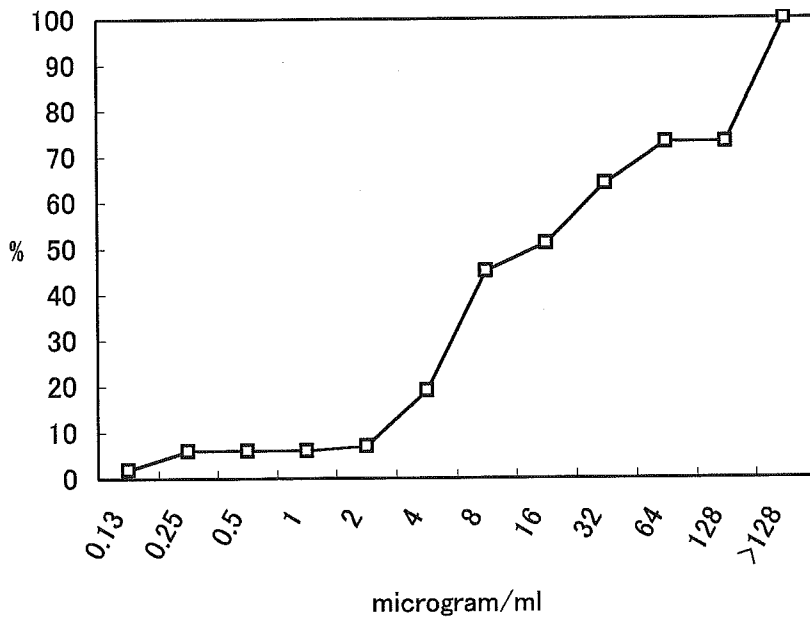


図 4b. LVFX 合剤に対する MIC と累積頻度

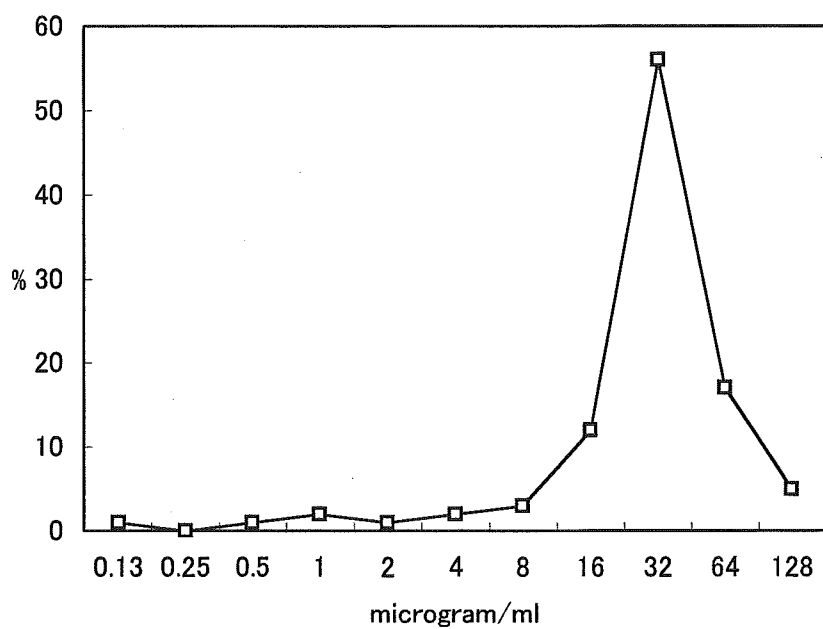


図 5a. BIPM に対する MIC と分離頻度

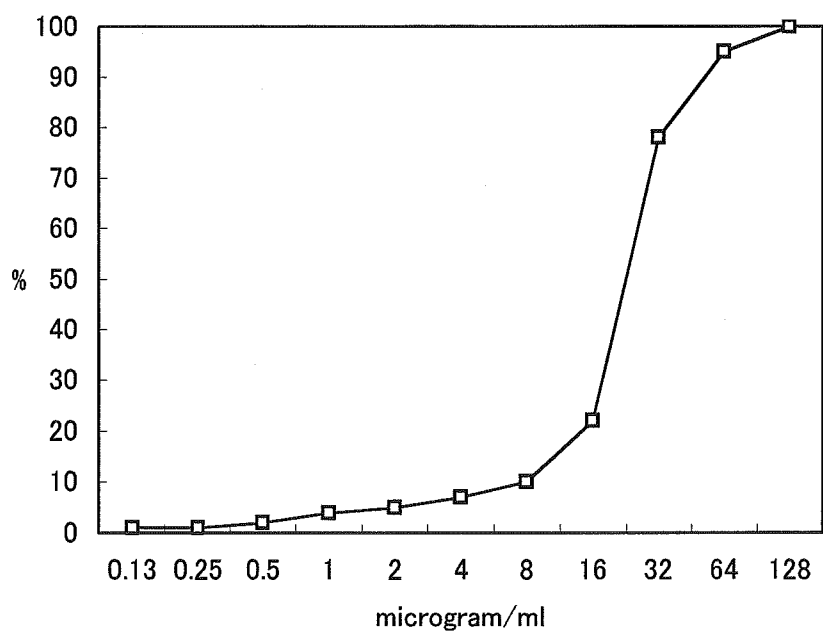


図 5b. BIPM に対する MIC と累積頻度

日本で最初に分離された VanD 型 VRE *E. raffinosus* GV5 の VanD 型耐性遺伝子群と
ddl 遺伝子に関する解析

主任研究者 池 康嘉^{1,2}

研究協力者 谷本 弘一²、野村 隆浩¹、富田 治芳¹、藤本 修平¹

荒川 宜親³

群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学¹、同薬剤耐性菌実験施設²

国立感染症研究所 細菌第二部³

研究要旨 日本で最初に分離された VanD 型 VRE である *E. raffinosus* GV5 の VanD 型耐性遺伝子群の全塩基配列を決定し遺伝子の構造解析を行ったところ、既報の VanD 型の VRE の耐性遺伝子群と同様のオペロン構造を持っていることがわかった。GV5 と同様の VanD4 型株である *E. faecium* 10/96A 株の遺伝子群と比較したところ GV5 の VanS_D は 10/96A の VanS_D と異なり IS の挿入を持たないが、アミノ酸置換が 1 カ所、センサー蛋白質としてリン酸化される His 残基近傍にあった。VanH_D は VanD と同様に 1 カ所のアミノ酸置換があった。VanY_D は不完全長のタンパク質しかコードされていない 10/96A 株とは異なり全長の VanY_D タンパク質がコードされていた。VanR_D と VanX_D の配列は 10/96A のものと全く同一であった。既報の VanD 型 VRE の *ddl* 遺伝子は変異によって不活化されていることが知られているので、GV5 の *ddl* 遺伝子の塩基配列を決定したところ菌種間で相同性の高い C 末端領域に 2 つのアミノ酸置換が見いだされたが明らかに遺伝子が不活化されるような変異は見あたらなかった。

A. 研究目的

腸球菌はヒト、動物の腸管常在菌で、典型的な日和見感染菌である。10 数種類の菌種があるが、臨床分離腸球菌は主として *E. faecalis* と *E. faecium* である。バンコマイシン耐性腸球菌 (Vancomycin resistant enterococci, VRE) は腸球菌の中で Vancomycin (VCM) 獲得耐性または自然耐性菌である。これまでに

6 種類のバンコマイシン耐性腸球菌が報告されている(表1)。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高度 VCM 耐性の A、B、D 型である。*E. raffinosus* GV5 は日本で最初に分離された *E. raffinosus* の VRE で、D-Ala:D-Lac ligase 遺伝子の塩基配列から VanD4 型である

こと、また、耐性遺伝子群は染色体上にあり、遺伝子発現は恒常的であることが報告されていた(1)。今回、バンコマイシン耐性遺伝子群と *ddl* 遺伝子の全塩基配列を決定し解析を行ったので報告する。

B. 材料および方法

用いた菌株:VanD 型 VRE *E. raffinosus* GV5。野生型の *E. raffinosus* *ddl* 遺伝子の塩基配列を知るために *E. raffinosus* 標準株 JCM8733 を用いた。

塩基配列の決定:VanD 型耐性遺伝子群については既報の塩基配列からプライマーを設計し、PCR 産物をシーケンスすることにより全塩基配列を決定した(図 1)。*E. raffinosus* の *ddl* 遺伝子については全塩基配列が報告されていないため、部分的に報告されている塩基配列を元に遺伝子内部の配列を PCR 産物をシーケンスすることにより決定した後、inverse PCR によって得られた PCR 産物をシーケンスすることによって全長の塩基配列を決定した。

C. 結果と考察

VanD 型耐性遺伝子群の DNA 塩基配列

全長 5654bp で図 1 に示すとおり、*vanR_D*、*vanS_D*、*vanY_D*、*vanH_D*、*vanD*、*vanX_D* の順に位置していた。これは既報の VanD 型耐性遺伝子群と同一であった。それぞれの遺伝子について GV5 と同じ VanD4 型株である *E. faecium* 10/96A 株と比較した結果は次の通りである。

- (VanR_D) *E. faecium* 10/96A と同一であっ

た。

- (VanS_D) 10/96A は N 末端領域に IS の挿入を持つため VanS_D は作られていないが GV5 は挿入変異を持たないため全長の VanS_D が作られている。しかしながら、図 2 に示すように 2 つのアミノ酸置換 (Thr₁₇Lys、Thr₁₇₀Ile) を持っていた。2 つのアミノ酸置換のうち前者は他の VanD 型 VRE との比較ではアミノ酸置換になっていない(図 2)。後者はセンサータンパク質である VanS_D の autophosphorylation 部位と考えられている 166 番目の His 残基の近傍に位置している。BM4339 (VanD1) 株の VanS_D は 173 番目のアミノ酸に変化 (Ser₁₇₃Pro) があり、これによって VanS_D の機能が損なわれ耐性遺伝子の発現が恒常的になったとされている。すでに報告したとおり GV5 の耐性発現も恒常的であるが(1)、得られた結果から、このアミノ酸置換によって GV5 は耐性発現が恒常的になっていると考えられる。
- (VanY_D) 10/96A は他の VanD 株に比べ不完全長の VanY_D しかコードしていないが、GV5 は全長の VanY_D をコードしていた。
- (VanH_D) 10/96A と比べアミノ酸置換が 1 カ所あった。
- (VanD) 10/96A と比べアミノ酸置換が 1 カ所あった。
- (VanX_D) 10/96A と同一であった。

ddl 遺伝子の DNA 塩基配列

既報の VanD 株の耐性発現はすべて恒常的

であり、すべての株の *ddl* 遺伝子が何らかの原因で不活化されていることが報告されている。そこで GV5 の *ddl* 遺伝子について調べたところ C 末端領域に 2 カ所のアミノ酸置換が見いだされた。図 3 に *E. raffinosus* と *E. faecium* の DDL のアミノ酸配列と GV5 におけるアミノ酸置換を示した。図 3 に示してあるとおり 2 つのアミノ酸置換 (Asn₂₇₁Asp、Gly₃₁₉Asp) は N 末端領域に比べ *E. raffinosus* と *E. faecium* のアミノ酸配列の相同性の高い C 末端領域に存在するが、挿入変異やナンセンス変異ではないためこの変異によって *ddl* 遺伝子が不活化されているか否かは明らかではない。しかしながら Gly₃₁₉Asp は 2 つの菌種間でよく保存されている領域にあることから、これによって *ddl* 遺伝子の不活化が起こっているかもしれない。

D. 結論

GV5 は既報の VanD 型 VRE と同様の構造の耐性遺伝子群を持つことがわかった。また、GV5 のバンコマイシン耐性遺伝子群が恒常的に発現することになった原因は、センサータンパク質である VanS_D の autophosphorylation 部位である His 残基近傍でのアミノ酸置換であることが明らかになった。

参考文献

- (1) 池 康嘉 2004「日本で初めて分離された VanD 型 VRE の解析」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」平成 15 年度 総括研究報告書

表1 バンコマイシン耐性腸球菌の分類

VRE遺伝子型	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG
MIC(μ g/ml)	64~>1000	4~>1000	2~32	64~>1000	16~24	12~16
TEIC	0.5~256	<0.5~8	0.5~1	4~256	0.5	0.5
耐性遺伝子存在部位	プラスミド・染色体	染色体・プラスミド	染色体	染色体	染色体	染色体
Ligaseで合成されるプロダクト	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser?
分離菌種	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. raffinosus</i>		
	<i>E. avium</i>		<i>E. flavescens</i>			
	<i>E. durans</i>					
	<i>E. gallinarum</i>					
	<i>E. casseliflavus</i>					
Ligase遺伝子	<i>vanA</i>	<i>vanB1</i>	<i>vanC1</i>	<i>vanD1</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>
		<i>vanB2</i>	<i>vanC2</i>	<i>vanD2</i>		
		<i>vanB3</i>	<i>vanC3</i>	<i>vanD3</i>		
			<i>vanD4</i>			

図1. GV5のVCM耐性遺伝子群の構造とPCRによって増幅された領域

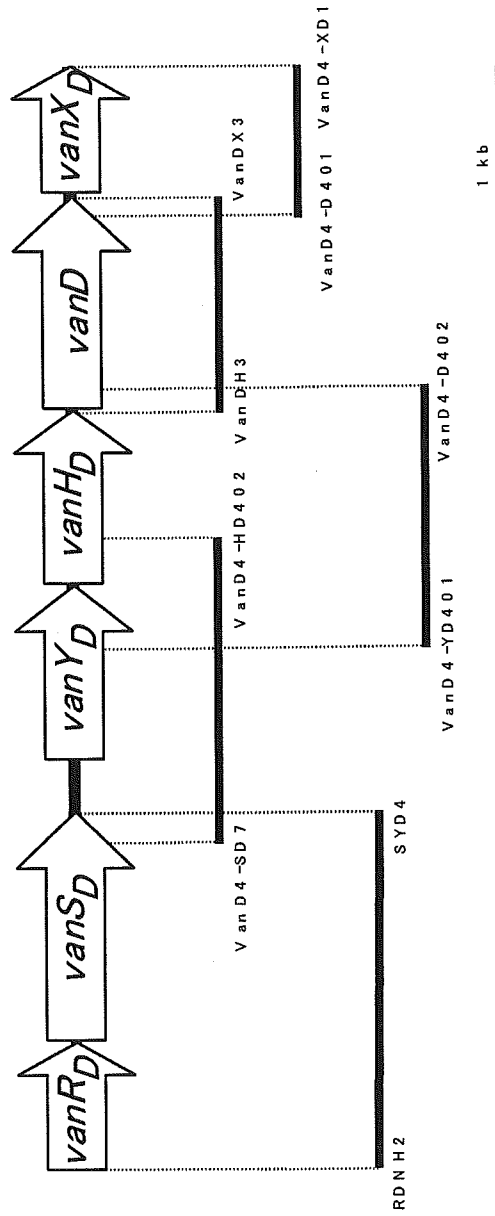


図2. VanD型VREにおけるVanS_DN末領域のアミノ酸配列

GV5	1:LKKNM	TSYEDDDYLLFK	NRLSVKILLMM	ACSIILISVVYLFV	LKDNFANVVVA	ILDRFIY	60
10/96A	1:LKKNM	TSYEDDDYLLF	TNRLSVKILLMM	ACSIILISVVYLFV	LKDNFANVVVA	ILDRFIY	60
BM4339	1:MKNR	KTSHEDDYLLF	KNRSLVKILLMM	VYSILIIAGVYLF	ILKDNFANVVVA	ILDSFIY	60
BM4416	1:MKNR	KTSHEDDYLLF	KNRSLVKILLMM	VYSILIIAGVYLF	ILKDNFANVVVA	ILDSFIY	60
GV5	61:HDR	EAVAVYLR	TFKAYE	IWLFLI	AVMGVFFVIFRRY	IDSISKYFFKEINRGIDTLVHEDT	120
10/96A	61:HDR	EAVAVYLR	TFKAYE	IWLFLI	AVMGVFFVIFRRY	IDSISKYFFKEINRGIDTLVHEDT	120
BM4339	61:HDR	EAVAVYLR	TFKASE	IWLFLI	AVMGVFFMIFRRY	IDSISKYFFKEINRGIDTLVNEDA	120
BM4416	61:HDR	EAVAVYLR	TFKAYE	IWLFLI	AVMGVFFMIFRRY	IDSISKYFFKEINRGIDTLVNEDA	120
GV5	121:ND	IALPPE	LASTERKINS	SIRHTLT	TKRKTDAELAE	QRKNDLVMYLAHDLKIP	LSSVIGYLN 180
10/96A	121:ND	IALPPE	LASTERKINS	SIRHTLT	TKRKTDAELAE	QRKNDLVMYLAHDLKIP	LSSVIGYLN 180
BM4339	121:ND	IGLPPE	LASTERKINS	SIRHTLT	TKRKTDAELAE	QRKNDLVMYLAHDLKIP	LPSVIGYLN 180
BM4416	121:ND	IGLPPE	LASTERKINS	SIRHTLT	TKRKTDAELAE	QRKNDLVMYLAHDLKIP	LPSVIGYLN 180

10/96Aについては挿入配列を除いた場合のアミノ酸配列を示した。

図3. *E. raffinosus* と *E. faecium* *ddf* 遺伝子のアミノ酸配列の相同性

```

1'  MEDIQLKIIL  LYGKSPEDH  VAILSAFSVI  SAVFYDYQV  QLIYIDKTGQ  WVKGPLLTEA
    .**.*  ***.***.***.  *.*****.  *.*****.  *.*****.  *.*****.  *.*****.  *.*****.
1"  MKITL  LYGGRSAEHE  VSILSAFSL  NAIYNYQV  QLVFITKEGQ  WVKGPLLTEK

61'  PETDETLRLT  WDPTEGHEVG  FSGKVIAPGD  IKEDNAIVFP  VLHGPNGEDG  TIQGFLETLD
    *...*.***.  ***.***.  ***.***.***.  ***.***.***.  ***.***.***.  ***.***.***.  ***.***.***.
56"  PASKDVLHLS  WDPGQTEEG  FTGKVINPGE  IKEGAIVFP  VLHGPNGEDG  TIQGFLETLN

121'  MPYVGAGVMT  SACAMDKIMT  KYILQAAGIP  QVPYVPVLKN  QWKENPKQIF  DKCEGTLLYP
    *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.
116"  MPYVGAGVLT  SACAMDKIMT  KYILQAAGVP  QVPYVPVLKN  QWKENPKKVF  DQCEGSLLYP

181'  MFIKPANMGS  SVGITRAENR  EELQNALQEA  YRYDSRALVE  QGIDAREIEV  AVLGNDDEVRT
    *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.
176"  MFVKPANMGS  SVGITKAENR  EELQNALATA  YQYDSRAIVE  QGIEAREIEV  AVLGNEDEVRT
    (D)

241'  TLPGEIVKEE  AFYDYNKYI  DNTIQMAIPA  NIPEEVMQKA  RDYAKSAYTM  LGGGSLSRID
    *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.
236"  TLPGEVVKDV  AFYDYEAKYI  NNKIEMQIPA  EVPEEVYQKA  QEYAKLAYTM  LGGGSLSRCD
    (D)

301'  FFLTNKNELF  LNELNTPGPF  TEFSMYPLLW  ENMGLKYGDL  IEELIQLGTK  RHEQRAALE
    *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.
296"  FFLTNKNELF  LNELNSMPGF  TEFSMYPLLW  ENMGLKYGDL  IEELIQLGMN  RYHQRSFFE
    *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.  *****.

```

ddf 遺伝子のアミノ酸配列、上段は JCM8733 下段は、*E. faecium* BM41477。()は GV5。

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 (H15-新興-9)

「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」

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

分担研究者：井上松久 北里大学医学部微生物・寄生虫学
研究協力者：岡本了一、中野竜一、兼子謙一、前山佳彦、石川直人

グラム陰性桿菌のセフェム薬耐性メカニズムとしての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(MBL)の実態を明らかにする目的で、神奈川県下における *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* および *P. mirabilis* を対象にセフェム薬耐性菌の実態調査を行った。その結果、ESBL 産生菌の検出率はそれぞれ 1.1, 0.4, 1.1 および 38.5%であり、*P. mirabilis* における検出率が顕著に高かった。検出された ESBLs の種類は CTX-M 型が最も多く、次いで TEM 型が多かった。また、pAmpC および MBL の検出率はそれぞれ 0.2 および 0.1%であり、検出されるもののその検出率は低かった。さらに、ESBLs や pAmpC 産生遺伝子に伴って検出され、これら β -ラクタマーゼ産生菌の高度耐性発現に関わっていると考えられている挿入配列の検出を行ったところ、ESBL 産生菌ではほとんどの株で *ISEcp1* が検出され、その約 60%の株では IS26 が同時に検出された。一方、pAmpC では IS26 が検出された株が多かった。

A. 研究目的

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(MBL)がある。これらの β -ラクタマーゼはわが国においても検出されるようになったが、その実態について

は明らかになっていないことも多い。そこで、神奈川県下の異なる地区の7施設の協力を得て、過去1年間(2004.6-2005.5)にわたり、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* および *P. mirabilis* を対象にセフェム薬耐性菌の実態調査を行った。加えて、ESBLs や pAmpC 産生遺伝子に伴って検出され、これら β -ラクタマーゼ産生菌の高度

耐性発現に関わっていると考えられている挿入配列の検出を行うとともに、CTX-M 型 ESBL 産生遺伝子の近傍の構造を明らかにした。

B. 研究方法

神奈川県下の異なる地域の 7 病院 (300-800 床) において 2004 年 6 月から 2005 年 5 月の一年間に分離された *E. coli* (3929 株)、*K. pneumoniae* (1575 株)、*K. oxytoca* (567 株) および *P. mirabilis* (296 株) 合計 6367 株を対象にした。これらの菌株について、CLSI の ESBL 産生菌スクリーニングテストの条件に従い、セフェム薬耐性菌 333 株を選択した。これらの株について薬剤感受性測定を行うとともに CVA、P/Case TEST およびメタロ-β-ラクタマーゼ SMA ディスクを用いて β-ラクタマーゼのクラス分けを行った。さらに、ESBLs、pAmpC および MLB の産生性の確認とそれぞれの β-ラクタマーゼの型別を行うためにそれぞれの β-ラクタマーゼに特異的なプライマーを用いた PCR を実施した。

CTX-M 型 ESBL 産生菌および pAmpC 産生菌については挿入配列 *ISEcp1* および *IS26* およびインテグロン *Int1* のそれぞれに特異的なプライマーを用いて PCR により検出した。さらに、CTX-M 型 ESBL 産生遺伝子が検出された株については PCR マッピングにより CTX-M 型 ESBL 産生遺伝子近傍の構造を解析した。

C. 研究結果

1) セフェム薬耐性菌の検出率

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 (Table 1)。

これらセフェム薬耐性菌のうち、プラスミド性の ESBLs、pAmpC および MBL が検出された割合は、*E. coli* ではそれぞれ 1.1, 0.2 および 0.1% であり、残り 2.9% 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 MLB の割合がそれぞれ 0.4, 0.2 および 0.3% であった。一方、*K. oxytoca* では ESBLs の割合は 1.1% であったが、残りの 4.2% 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 産生菌であり、グラム陰性桿菌におけるプラスミド性のセフェム薬耐性化は ESBL 産生によるところが大きいことが判明した。

2) セフェム薬耐性菌から検出されたプラスミド性 β-ラクタマーゼの種類

上記 4 菌種において検出された ESBL 産生菌 170 株について、ESBLs の型別を行ったところ、CTX-M 型

ESBLs の検出率が 88% と最も高く、次いで TEM 型が多かった (Table 2)。

さらに、CTX-M 型 ESBLs についてグループ型別を行ったところ、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* から検出されたものは CTX-M-1, CTX-M-2 および CTX-M-9 グループのいずれかに型別されたが、中でも CTX-M-9 グループに属するものが最も多かった。一方、*P. mirabilis* から検出された CTX-M 型 ESBLs はすべて CTX-M-2 グループであった。

3) 挿入配列およびインテグロンの検出

pAmpC 産生菌 12 株および ESBL 産生菌のうち CTX-M 型産生菌 141 株について、挿入配列 *ISEcp1* と IS26 およびインテグロン *Int 1* の検索を行った (Table 3)。

pAmpC 産生菌のうち CMY 型産生株では *ISEcp1* が検出されとともに、同時に IS26 が検出された株も存在した。一方、DHA 型産生株では *ISEcp1* は検出されず、IS26 のみが検出された。しかし、いずれの pAmpC 産生菌においても *Int 1* は検出されなかった。

CTX-M 型 ESBL 産生菌では、141 株中 138 株(98%)から *ISEcp1* が検出された。また、同時に IS26 が検出された株が 81 株(58%)存在した。さらに *Int1* をも同時に保有する株が 59 株(42%)も存在した。

そこで、CTXM 型 ESBL 産生菌 141

株については β -ラクタマーゼ構造遺伝子 *bla*_{CTX-M} 近傍の領域について PCR マッピングを行い *ISEcp1* と IS26 の存在部位を解析した (Table 4)。その結果、両 IS の存在の仕方から A-F の 6 型に分類することができた。*ISEcp1* は *bla*_{CTX-M} の 45-128bp 上流に挿入されていたが、ほとんどの株では 48bp 上流に挿入されていることが確認された。また、*ISEcp1* の挿入が確認された 138 株のうち、84 株(60%)では IS26 が同時に検出されたが 81 株(58%)では IS26 は *ISEcp1* からは離れた位置に存在することがわかった。残り 3 株については、IS26 が *ISEcp1* の中に挿入されていることが明らかになった。

C. 考察および E. 結論

神奈川県下の 7 病院においてセフェム薬耐性菌の実態調査を行ったところ、ESBL 産生菌の検出率は、*E. coli* および *K. pneumoniae* でそれぞれ 1.1 および 0.4% と、同地域で 5 年前に行われた調査結果 (それぞれ 1.1 および 0.4%) と比較して大きな変動は認められなかった。しかし、今回の調査では、前回調査では検出されなかった pAmpC 産生菌や MBL 産生菌がそれぞれ 0.2 および 0.1% とその率は低いものの検出されるようになった。また、前回調査では対象になっていなかった *P. mirabilis* において ESBL 産生菌が 38.5% も検出された。

今回検出された ESBL 産生菌の多く

は、CYX-M 型 ESBL 産生菌であり、その産生遺伝子上流には強力なプロモーター配列を伴う *ISEcp1* が存在していることが明らかとなり、セフェム薬高度耐性化に大きく関与していることが示唆された。さらに、これらの多くが IS26 やインテグロン *Int1* を同時に多様な組合せで伴っていることも明らかとなり、これら転移能を有する挿入配列が染色体上の β -ラクタマーゼ遺伝子がプラスミド化する過程で重要な役割を担っていると考えられる。

また、今回の調査で明らかになった高頻度に検出された *P. mirabilis* における ESBL 産生菌については現在詳細な解析を行っているが、これまでに明らかになっている事実は、1) PFGE の結果から必ずしも同一菌株の広がりでないこと、2) 検出されたすべての株が CTX-M2 型 ESBL を産生すること、3) 検出されたすべての株が *ISEcp1* を保有していること、4) ESBL 産生遺伝子を保有するプラスミドの約 60% が IncT に属すること、さらに、5) ESBL 産生菌の約 60% が同時にニューキノロン耐性菌であることである。なぜ、このように *P. mirabilis* に ESBL 産生菌が急速に広がったのか、また、同時にニューキノロン耐性なのかは現時点では不明である。しかしながら、今後 *P. mirabilis* における ESBL 産生菌の動向には十分注意を払う必要がある。

さらに、今回の調査で明らかになったように、pAmpC 産生菌や MBL 産生菌が僅かではあるが、腸内細菌科の菌から分離されるようになったことも今後十分な注意が必要であろう。

F. 研究発表 (論文)

- 1) 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(6):2955-8. 2005.
- 2) Kaneko K, Sato Y, Tokunaga SK, Tamaki SK, Okamoto R, Inoue M. AmpC beta-lactamase-mediated cefpodoxime-resistant *Escherichia coli* isolated from faecal samples of healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 57(2):369-71, 2005
- 3) Nakano R, Okamoto R, Nagano N, Inoue M. Resistance to gram-negative organisms due to high-level expression of plasmid-encoded *ampC* β -lactamase *bla*CMY-4 promoted by insertion sequence *ISEcp1*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* (submitted)
- 4) Nakano R, Abe M, Maeyama Y,

Ishikawa N, Inoue M, Okamoto R. Regional Outbreak of CTX-M-2 β -Lactamase Producing *Proteus mirabilis* in Japan. Clin. Infec. Dis. (submitted)

(学会発表)

- 1) Nakano R, Okamoto R, Maeyama Y, Ishikawa N, Abe M, Inoue M. Outbreak of CTX-M-2 Group β -Lactamase Producing *Proteus mirabilis* in Japan. 45th ICAAC (Washington, DC) Dec. 2005
- 2) 前山佳彦、中野竜一、石川直人、井上松久、岡本了一。神奈川県下で実施した β -lactamase 産生菌の実態調査、第 53 回日本化学療法学会 2005 年 5 月 (東京)

- 3) 中野竜一、岡本了一、前山佳彦、石川直人、阿部美知子、井上松久。臨床より分離されたセフェム系薬耐性 *Proteus mirabilis* の分子疫学的調査ならびに耐性拡散の背景、第 52 回日本化学療法学会東日本支部総会 2005 年 10 月 (東京)

- 4) 前山佳彦、中野竜一、石川直人、阿部美知子、井上松久、岡本了一。プラスミド性 AmpC、Metallo- β ラクタマーゼおよび CTX-M 型 ESBL 産生菌の分子疫学調査ならびに耐性拡散の背景、第 52 回日本化学療法学会東日本支部総会 2005 年 10 月 (東京)