

FIG. 1. Structure of the transposon modules forming the backbone of Tn2610. Arrows above open bars indicate the transcription orientations of the ORFs. Restriction cleavage sites shown are those used for the construction of plasmid derivatives described in Materials and Methods. The structures and restriction sites are based on GenBank sequences for Tn2610 (accession no. AB207867) and TnI721 (X61367). Abbreviations: A, *Ava*I; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; S, *Sal*I.

TABLE 1. Features of ORFs and discrete DNA segments in Tn2610

Location <sup>a</sup> (5'-3')	DNA segment	ORF <sup>b</sup>			% Homology (DNA/aa)	Description of gene or gene product (accession no.)
		No.	Name	Size <sup>c</sup>		
1-38	IR					38-bp IR in IRa of Tn2610
34-3000		S01	<i>tnpA</i>	988	99.7/99.2	Transposase from TnI721 (X61367)
3004-3564		S02	<i>tnpR</i>	186	99.8/100	Resolvase from TnI721 (X61367)
3627-3755	<i>res</i>					<i>resIII</i> (3627-3656), <i>resII</i> (3661-3703), <i>resI</i> (3717-3755)
3740-4324		S03	<i>tnpM</i>	194	100/100	TnpM on Tn21 (AF071413)
4091-5376	5'-CS					Partial 5'-CS of class 1 integron (AF261825)
4091-4114	IRi					IRi of class 1 integron (AF261825)
4293-5306		S04	<i>intI1</i>	337	100/100	Integrase of class 1 integron (AY214164)
5873-6079		S05	small ORF	68	100/100	Small ORF from pIP1527 (X03988)
6079-7338		S06	<i>ereB</i>	419	100/100	Erythromycin esterase type II (X03988)
7661-9145		S07	<i>orf2</i>	494	100/100	Putative OrfA from SG11 (AF261825)
9420-10073		S08	<i>groEL/intI1</i>	217	100/100	GroEL/integrase fusion protein from SG11
9777-10209	5'-CS					Partial 5'-CS of class 1 integron (AF261825)
10154-10209	<i>attI</i>					<i>attI</i> of class 1 integron (AF261825)
10279-11145		S09	<i>pse-1</i>	288	100/100	PSE-1 $\beta$ -lactamase from SG1 (AF261825)
11275-12054		S10	<i>aadA2</i>	259	100/100	Streptomycin resistance protein (AF164956)
12056-12114	59 bp					59-bp element of class 1 integron (AF261825)
12114-14134	3'-CS					3'-CS of class 1 integron (AF261825)
12218-12565		S11	<i>qacEΔI</i>			Quaternary ammonium compound and disinfectant resistance partial protein on SG1
12559-13398		S12	<i>sulI</i>	279	100/100	Sulfonamide resistance protein on SG1
13526-14026		S13	<i>orf5</i>	166	100/100	Putative acetyltransferase in Tn21 (AF071413)
14050-14134		S14	<i>orf6Δ</i>			Hypothetical partial protein (AF261825)
14135-14160	IR					Terminal IR of IS1326 (AY123253.3)
14202-14987		S15	<i>istB</i>	261	100/100	Unknown function of IS1326 (AY123253.3)
14974-16497		S16	<i>istA</i>	507	100/100	Possible transposase of IS1326 (AY123253.3)
16579-16590	IR					Terminal IR of IS1353 (AY123523)
16620-18164		S17	OrfAB	516	100/100	OrfAB from IS1353 (AY123523)
18180-18192	IR					Terminal IR of IS1353 (AY123523.3)
18195-18280	IR					Terminal IR of IS1326 (AY123253.3)
18215-19075		S18	<i>tniBΔI</i>			Truncated TniB from In2 (U42226)
19078-19512		S19	<i>tniA</i>			Partial TniA of In2 (U42226)
19513-19527	IR					IR of IS26 (AY123523)
19575-20282		S20	<i>tnpA</i>	235	100/100	Transposase of IS26 (AY123523)
20321-20333	IR					IR of IS26 (AY123523)
20334-20881		S21	<i>tnpR</i>			Truncated resolvase of Tn21 (AF071413)
20884-23850		S22	<i>tnpA</i>	988	100/100	Transposase of Tn21 (AF071413)
23846-23883	IR					38-bp IR in IRb of Tn2610

<sup>a</sup> Nucleotide position in the sequence deposited under accession no. AB207867.

<sup>b</sup> Named ORFs are based on those previously characterized.

<sup>c</sup> Expressed as the number of amino acid residues.

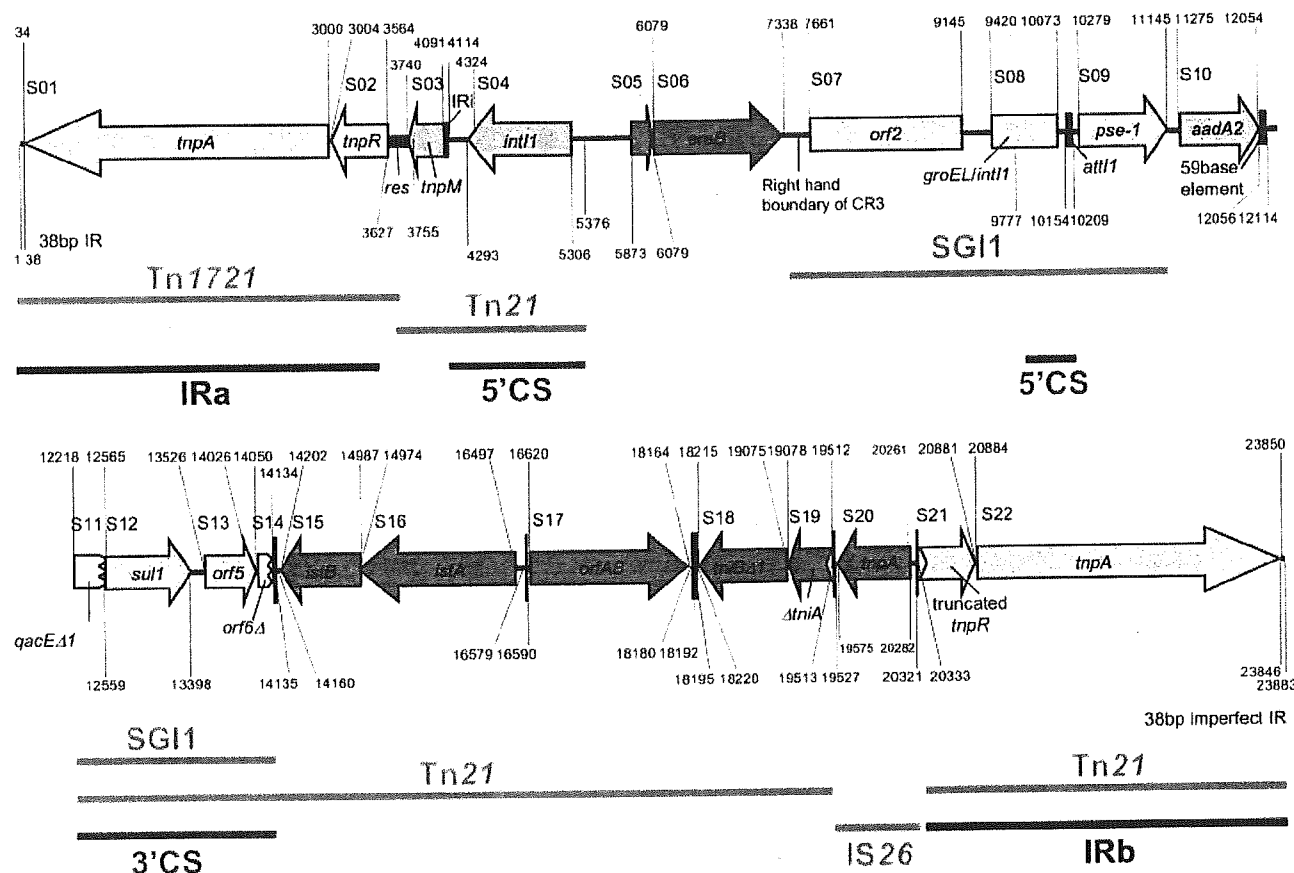


FIG. 2. Genetic organization of Tn2610 based on complete nucleotide sequence analysis. Labeled lines represent the regions in which sequences exhibit significant homology to extant sequences on various genetic elements. The accession numbers of the sequences used for comparative analysis are given in Table 1.

instructions. DNA fragments were separated by electrophoresis on 1% (wt/vol) agarose gels, and individual fragments were isolated from the gels using a QIAEX II gel extraction kit (QIAGEN). HindIII-digested lambda phage DNA fragments and HinfI-digested pBR322 plasmid DNA fragments were used as size markers.

**Sequence analysis.** Sequencing was performed in the facility at QIAGEN, Japan, on an ABI PRISM model 3100 sequencer. DNA sequences were assembled using the GENETYX version 10.1 software package. PCR was used to amplify the pTKY170 fragments to confirm the boundaries between the cloned fragments predicted by mapping and to obtain sequences. The sequence obtained was used to query the GenBank database in order to identify putative genes by using the BLAST program via the World Wide Web interface of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Nucleotide sequence accession number.** The 23,883-bp sequence of Tn2610 has been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession no. AB207867.

**RESULTS AND DISCUSSION**

**General features of the Tn2610 sequence.** To complete the sequence of Tn2610, plasmid pTKY170 (formerly named pMK1::Tn2610#4 [20]), containing a complete copy of the transposon, was initially subjected to restriction analysis, and relevant fragments were subcloned for sequencing. The complete sequence of the 23,883-bp region bracketed by the previously characterized inverted repeats IRa (formerly named

IR-R) and IRb (formerly named IR-L), which are defined by 5-bp direct repeats at their outer ends, was determined. A total of 22 open reading frames (ORFs) were identified and are listed in Table 1. The putative products encoded by these ORFs either were identical to or exhibited significant homology to protein sequences available in GenBank. The nature and positions of relevant features (even in the noncoding regions) are also shown in Table 1. Figure 2 is a linear map of Tn2610 showing the transposon structure.

**Tn2610 contains two modules for transposition.** Analysis of the sequence showed that Tn2610 is composed of two transposition modules, a Tn1721-like module and a Tn21-derived module, which correspond, respectively, to IRa and IRb (Fig. 2). Within the Tn1721-like (IRa) module, the transposase gene *tnpA*, the resolvase gene *tnpR*, and the *res* site show strong homology to the corresponding regions of Tn1721 (Table 1; Fig. 2 and 3) (1). A 38-bp sequence was identified at one end of IRa, differing in 3 bases from that in Tn1721 (Fig. 3A). The 129-bp *res* site of IRa is identical to that of Tn1721 as far as *resI*, where recombination has occurred with the *res* site of Tn21 (Fig. 3B) (16).

In contrast, IRb is a Tn21 remnant including a partially deleted *tnpR* gene, *tnpA*, and a 38-bp IR identical to those in

(A) 38bp IR in

IRa GGGGAGCCCGCAGAATTCGGAAAAAATCGTACGCTAAG  
 \*\*\*\* \* \* \* \* \*  
 Tn1721 GGGGGAACCGCAGAATTCGGAAAAAATCGTACGCTAAG  
 IRb GGGGTCTCTCAGAAAACGGAAAAATAAGCACGCTAAG  
 \* \* \* \* \*  
 Tn21 GGGGTCTCTCAGAAAACGGAAAAATAAGCACGCTAAG  
 IRa GGGGAGCCCGCAGAATTCGGAAAAAATCGTACGCTAAG  
 \*\*\*\* \* \* \* \* \*  
 IRb GGGGTCTCTCAGAAAACGGAAAAATAAGCACGCTAAG

(B) res site in

Tn21  
 IRa *tnpR*  
 CGGTGCCCTGCAGGATGTCTCCTTGAAGGCGGCTTAAGT  
 \* \* \* \* \*  
 Tn1721 CGGTGCCCTGCAGGATGTCTCCTTGAAGGCGGCTTAAGT  
 Tn21 *tnpR*  
 GCCTGCCAGTCAATGGAATTCCTGCAAAATGTCAT  
 \* \* \* \* \*  
 IRa GCACCTTCTGTTCGGTTGTGCCTCAAAGCCCATTTCTGTCAT  
 \* \* \* \* \*  
 Tn1721 GCACCTTCTGTTCGGTTGTGCCTCAAAGCCCATTTCTGTCAT  
 res III  
 Tn21 GGGAAAGACTTATGACCTTCAACGAGATATGTCAAATAAAT  
 \*\* \* \* \* \* \*  
 IRa GGCTGAAATCTATAACCTTCGCGGGCAATGTGTCAAAAATG  
 \* \* \* \* \*  
 Tn1721 GGCTGAAATCTATAACCTTCGCGGGCAATGTGTCAAAAATG  
 res II  
 Tn21 CAAAATCAATCCTATCCTGACGCAATTTACACATGGCCTATC  
 \*\*\* \* \* \* \* \*  
 IRa GGAAAGCAGACTCTATTCTGACGAAGCGGCGCGCCCTGCC  
 \* \* \* \* \*  
 Tn1721 GGAAAGCAGACTCTATTCTGACGAAGCGGCGCGCCCTGCC  
 res I  
 Tn21 TGACATCAGGTTAGGGTATGCCTCAACCTGACGCGCGG  
 \* \* \* \* \*  
 IRa TGACATCAAGTTAGGGTATGCCTCAACCTGACGCGCGG  
 \* \* \* \* \*  
 Tn1721 TGACATCAAGTTAGGGTATAGCCTAGATTGACATGCGC

FIG. 3. Comparison of the 38-bp inverted repeats (A) and *res* sites (B). The sequences of the 38-bp inverted repeats and *res* sites in Tn2610 IRa (this study), Tn1721 (accession no. X61367), and Tn21 (accession no. AF071413) are aligned, with asterisks indicating identical bases. The *res* subsites (9) are boxed, and the AT site at which resolvase-mediated recombination takes place is boldfaced. The recombination crossover point to generate the hybrid *res* is indicated by a vertical arrow. *tnpR* and *tnpM*, regions adjacent to each end of the *res* sites.

Tn21 (Fig. 2). The *tnpR* gene is interrupted by the insertion of an IS26 insertion element, leading to the loss of 12 bp including the ATG start codon of the gene and the *res* site. Taking all these findings together, we conclude that Tn2610 is bracketed

TABLE 2. Complementation of a Tn1722Δ*tnpA* mutant

Complementing plasmid ( <i>tnpA</i> )	Transposition frequency <sup>a</sup>
pTKY175 (Tn1722).....	2.3 × 10 <sup>-2</sup>
pTKY174 (Tn2610 IRa).....	3.0 × 10 <sup>-2</sup>
pACYC184.....	<10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup> Determined as described in Materials and Methods.

by 38-bp imperfect IRs (10-bp differences) (Fig. 3) at both ends and carries two intact *tnpA* genes, one intact *tnpR* gene, and one *res* site as a transposition module.

Our earlier analysis indicated that *tnpA* in IRb is functional, while *tnpA* in IRa is not functional, in the transposition of Tn2610 (19). Although the IRa module shows strong homology to that of Tn1721, the corresponding genes are not identical. The *tnpA* gene in IRa differs from the Tn1721 sequence at nine positions, leading to the alteration of 7 amino acid residues. Furthermore, a 3-base difference is found in the 38-bp IR sequences between IRa and Tn1721 (Fig. 3A). Therefore, the inability of *tnpA* in IRa to promote the transposition of Tn2610 may be due to a mutation. To determine whether the *tnpA* gene of IRa is active, the ability of the product to promote the transposition of Tn1721 was examined by complementation analysis of a Tn1722 *tnpA*-defective mutant as described in Materials and Methods. As shown in Table 2, the *tnpA* gene in IRa complemented the *tnpA* defect in Tn1722, suggesting that it is active even though it cannot promote the transposition of Tn2610. The Tn1721-like *tnpA* product of IRa probably cannot recognize the 38-bp element at the end of IRb, while the Tn21-like *tnpA* product of IRb recognizes both 38-bp elements, even though they are imperfect. This hypothesis is supported by a report showing that the Tn21 *tnpA* products can act on the IR of Tn501 (which is identical to the IR of Tn1721) but the Tn501 *tnpA* product cannot promote the transposition of Tn21 (8).

**The intervening nonrepeated region of Tn2610.** Analysis of the intervening nonrepeated region from nt 3514 to nt 20333 reveals the presence of discrete DNA regions carried between the two transposition modules in Tn2610 (Fig. 2).

The Tn1721-like transposition module merges (at the *res* site) with a Tn21-derived sequence (nt 3565 to 5376) including *tnpM* and the 5' conserved segment (5'-CS) of the class 1 integron (the insertion site of the integron IRI into *tnpM* is identical to that in Tn21). The *intI1* gene, in this case, is not preceded by an *attI1* site (14) with inserted gene cassettes but by a segment containing the *ereB* gene (2) with part of CR3 (15). The right-hand boundary of CR3 merges with a long region (nt 7339 to 14134) identical to a part of *Salmonella* genomic island I (SGI1) (5) of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT104 except for the presence of an additional *aadA2* cassette in Tn2610. This region includes *orf2* (5, 11), the remnant of the 5'-CS of a class 1 integron containing an *intI1-groEL* hybrid, two gene cassettes (*bla*<sub>PSE-1</sub> and *aadA2*), and the 3'-CS of a class 1 integron including *qacEΔ1*, *sul1*, *orf5*, and *orf6Δ* (Fig. 2), which is also identical to that found in In2 carried on Tn21 (11, 15). The homology with In2 continues down to the *tmiA* gene, which is interrupted by the

IS26 insertion element (at nt 20333) located between this region and IRb (Fig. 2).

This complex mosaic structure is likely derived by multiple recombination events which involved Tn21-like and SGI1-like sequences, as well as other sequences.

**Concluding remarks.** The present study has shown that Tn2610 is a composite transposon comprising two transposition modules, Tn1721-like IRa and Tn21-derived IRb, surrounding a central region containing the drug resistance genes *ereB*, *pse-1*, *aadA2*, and *sull*. It is proposed that the ancestors of Tn1721 and Tn21 were independently inserted into a plasmid or genome via transposition events catalyzed by their own transposition modules, leading to the backbone of Tn2610. Later, genes could have been lost by deletion during or after the acquisition of the regions that include the integrons. This seems plausible, since a transposon carrying *mphB* with an organization very similar to that of the transposition modules in Tn2610 has been found in *E. coli* (12).

SGI1 has been identified in DT104, whose prevalence increased dramatically in the 1990s (4, 5, 7, 10). DT104 isolates have been reported to be resistant to a core group of antibiotics including ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamide, and tetracycline (commonly abbreviated ACSSuT). Furthermore, a number of variants of SGI1 that are associated with different resistance phenotypes (e.g., ACSSuS plus trimethoprim, SSu, ASu, and ASSuT) have been identified, suggesting that the multidrug resistance region of SGI1 was subject to recombination events that generated variants (4, 6). Since Tn2610 was found in a plasmid from a strain isolated before SGI1-containing strains, it could also have been involved in the generation of SGI1 structures.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Tomoyasu and N. Kon for technical assistance.

This work was supported in part by a grant from the Research Project for Emerging and Reemerging Infectious Diseases (H15-Shinkou-9) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

#### REFERENCES

- Allmeier, H., B. Cresnar, M. Greck, and R. Schmitt. 1992. Complete nucleotide sequence of Tn1721: gene organization and a novel gene product with features of a chemotaxis protein. *Gene* 111:11–20.
- Arthur, M., D. Autissier, and P. Courvalin. 1986. Analysis of the nucleotide sequence of the *ereB* gene encoding the erythromycin esterase type II. *Nucleic Acids Res.* 14:4987–4999.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513–1523.
- Boyd, D., A. Cloeckaert, E. Chaslus-Dancla, and M. R. Mulvey. 2002. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1714–1722.
- Boyd, D. A., G. A. Peters, A. Cloeckaert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts, and M. R. Mulvey. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* 183:5725–5732.
- Doublet, B., D. Boyd, M. R. Mulvey, and A. Cloeckaert. 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol. Microbiol.* 55:1911–1924.
- Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar, and F. J. Angulo. 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N. Engl. J. Med.* 338:1333–1338.
- Grinsted, J., F. de la Cruz, and R. Schmitt. 1990. The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid* 24:163–189.
- Hall, S. C., and S. E. Halford. 1993. Specificity of DNA recognition in the nucleoprotein complex for site-specific recombination by Tn21 resolvase. *Nucleic Acids Res.* 21:5712–5719.
- Izumiya, H., J. Terajima, S. Matsushita, K. Tanuma, and H. Watanabe. 2001. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 39:2700–2703.
- Liebert, C. A., R. M. Hall, and A. O. Summers. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:507–522.
- Noguchi, N., J. Katayama, and M. Sasatsu. 2000. A transposon carrying the gene *mphB* for macrolide 2'-phosphotransferase II. *FEMS Microbiol. Lett.* 192:175–178.
- Ouellette, M., L. Bissonnette, and P. H. Roy. 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1  $\beta$ -lactamase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7378–7382.
- Partridge, S. R., G. D. Recchia, C. Scaramuzzi, C. M. Collis, H. W. Stokes, and R. M. Hall. 2000. Definition of the *attI1* site of class I integrons. *Microbiology* 146:2855–2864.
- Partridge, S. R., H. J. Brown, H. W. Stokes, and R. M. Hall. 2001. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1263–1270.
- Rogowsky, P., S. E. Halford, and R. Schmitt. 1985. Definition of three resolvase binding sites at the *res* loci of Tn21 and Tn1721. *EMBO J.* 4:2135–2141.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Tanaka, M., T. Yamamoto, and T. Sawai. 1983. Evolution of complex resistance transposons from an ancestral mercury transposon. *J. Bacteriol.* 153:1432–1438.
- Yamamoto, T. 1989. Organization of complex transposon Tn2610 carrying two copies of *mpA* and *mpR*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:746–750.
- Yamamoto, T., M. Watanabe, K. Matsumoto, and T. Sawai. 1983. Tn2610, a transposon involved in the spread of the carbenicillin-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene. *Mol. Gen. Genet.* 189:282–288.
- Yamamoto, T., S. Yamagata, Y. Hashimoto, and S. Yamagishi. 1980. Restriction endonuclease cleavage maps of the ampicillin transposons Tn2601 and Tn2602. *Microbiol. Immunol.* 24:1139–1149.

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	95
山口 恵三 (東邦大学 医学部 微生物学講座)	
9. サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学	100
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)	
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	105
渡辺 治雄 (国立感染症研究所 細菌第一部)	
11. <i>Staphylococcus aureus</i> PBP のイミペネムに対する反応性	111
和田 昭仁 (国立感染症研究所 細菌第一部)	

### 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 法によりセフォクキシム（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 の大きさと、*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  $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$  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 はペロ毒素 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 インテグロン 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

### 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關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關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、新たな新型の臨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、常に変化し發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、さらに發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證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 (セフトチヂム) 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 (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。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 *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。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 *gryA* 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。