

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 μ 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、 β -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。荒川等によるポロン酸化合物を用いた新たな Class C β -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 β -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]。

β -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 β -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 β -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 β -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 β -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 β -ラクタマーゼはその生産量が多く、多剤 β -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 β -ラクタマーゼ生産プラスミドの Class C β -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 β -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- β -ラクタマーゼは、すべての β -ラクタム剤を加水分解する。その阻害剤は β -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 PhenylCnSH 化合物と QuinolineCnSH 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 β -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、 β -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 β -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 β -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 β -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。 β -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

離株での分離の実態を研究した。この酵素遺伝子は接合伝達性プラスミド上に存在するため、細菌間で拡散する可能性が高い【荒川】。緑膿菌の薬剤耐性排出機構によりカルバペネム感受性となる機構を解明した【後藤】。多剤β-ラクタム剤耐性（基質拡張型β-ラクタマーゼ、ESBL）を生産する腸管出血性大腸菌026を発見した【山口(石井)】。VREの中で腸球菌のフェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド上のVanB遺伝子を、院内感染原因菌の中で発見した【池】。これらは今後の詳しい解析により新知見が発見され、厚生労働行政に有用と考えられる。

(2) 薬剤耐性菌の迅速検出方法：ポロン酸化化合物を用いたグラム陰性菌のクラスCβ-ラクタマーゼをDISK拡散法により検出できる簡便検出方法【荒川】。緑膿菌の薬剤排出機構に関連する蛋白阻害剤を用いることによる特定の薬剤排出機構を発見する簡便検出方法【後藤】。リアルタイムPCRを用いた腸チフス、パラチフスのニューキノロンの低感受性菌の検出方法【渡辺(広瀬)】。これらの検出方法の開発は厚生労働行政に直結するものである。特にクラスCβ-ラクタマーゼ簡便検出方法【荒川】は完成度の高いもので

ある。

(3) 薬剤耐性菌の疫学的研究：グラム陰性臨床分離菌のCTM-M型ESBL生産菌の調査研究【荒川】。

(4) 薬剤耐性機構、薬剤耐性遺伝子構造の研究：グラム陰性菌のampCβ-ラクタマーゼ多量生産機構の研究【井上(岡本)】。*Salmonella Typhimurium*の多剤耐性遺伝子構造の解析【山本】。黄色ブドウ球菌のPBPsの機能解析【和田】。

(5) その他：不活酵素阻害剤の化学的研究。メタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤のスクリーニングを行った【黒崎】。

(3)(4)(5)いずれも検出方法開発のための疫学および基礎的研究で、今後の成果が期待できる。

(6) VCMヘテロ耐性MRSAの問題：VCMヘテロ耐性MRSAの問題点を明確に指摘したもので、検査方法および治療方法において検査レベルおよび臨床現場の混乱と浪費を收拾するための一つの解答を提供したもので、厚生労働行政に多大な貢献をした【荒川・池・長沢】。

G. 研究成果

1) Ishii Y, Yamaguchi K, et al. Evaluation

- of Antimicrobial Activity of beta-Lactam Antibiotics by Etest against Clinical Isolates from 60 Medical Centers in Japan. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 2005 25(4):296-301.
- 2) Ishii Y, Yamaguchi K, et al. ESBL producing Shiga Toxin (stx1) positive *Escherichia coli* O26:H11: A new concern. **J. Clin. Microbiol.** 2005 43(3):1072-1075.
- 3) 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.** 2005 Feb 15;243(2):347-54.
- 4) Matsuoka M, Arakawa Y, et al. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. **Antimicrob Agents Chemother.** 2004 48(12):4624-4630.
- 5) Kanai K, Arakawa Y., et al. Growth Competition of Macrolide-Resistant and -Susceptible *Helicobacter pylori* Strains. **Microbiol Immunol.** 2004 48(12):977-980.
- 6) Nishio H, Arakawa Y., et al. Metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. **J. Clin. Microbiol.** 2004 42(11): 5256-5263.
- 7) Nagano N, Arakawa Y., et al. Nosocomial Transmission of CTX-M-2 β -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* in a Neurosurgery Ward. **J. Clin. Microbiol.** 2004 42(9): 3978-3984.
- 8) Wachino J, Arakawa Y., et al. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A β -lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the Ω -loop. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004 48(8): 2905-2910.
- 9) Doi Y, Arakawa Y., et al. Inhibitor-sensitive AmpC β -lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004 48(7):

2652-2658.

10) Doi Y, Arakawa Y., et al. Spread of novel aminoglycoside resistance gene *aac(6')*-Iad among *Acinetobacter* clinical isolates in Japan. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004 48(6): 2075-2080.

11) Yamane K, Arakawa Y., et al. Genetic environments of the *rmtA* gene found in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004 48(6): 2069-2074.

12) Wachino J, Arakawa Y., et al. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a neonatal ICU in Japan. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004 48(6): 1960-1967.

13) Jin W, Arakawa Y, et al. Comparative study of the inhibition of metallo-beta-lactamases (IMP-1 and VIM-2) by thiol compounds that contain a hydrophobic group. **Biol. Pharm. Bull.** 2004 227(6), 851-856.

14) Kimura S, Yamaguchi K, et al. Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in

ceftazidime hydrolysis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004 48(5):1454-60.

15) Arakawa Y, Ike Y, Nagasawa M. Where has vancomycin-heterogeneously resistant *Staphylococcus aureus* gone? **Lancet** 2004 363(9418):1401.

16) Doi Y, Arakawa Y., et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004 48(2) 491-496.

17) Shiraki Y, Arakawa Y., et al. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. **Emerg. Infect. Dis.** 2004 10(1):69-75.

18) McCallum N, Wada A, et al. *TcaR*, a putative *MarR*-like regulator of *sarS* expression. **J. Bacteriol.** 2004 186:2966-2972.

19) Maki H, Wada A, et al. *tcaA* inactivation; a step to vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus* (VISA) clinical isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2004 48:1953-1959.

その他研究成果は各班員の報告書の中に記載。

H. 知的所有権の出願・登録状況

II. 分担研究報告書（平成16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

- 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 -

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

従来報告されているアミノグリコシド(AG)修飾酵素では不活化されにくいといわれていたアルベカシン(ABK)に対して高度の耐性を有する緑膿菌およびセラチアなどのグラム陰性桿菌が国内で分離され、それらの株は、カナマイシンやゲンタマイシンなどのAGを産生する放線菌が、自己の16S rRNAをメチル化して保護するために産生する16S rRNAメチラーゼ遺伝子に類似した遺伝子を保持していることが、これまでの我々の研究で明かとなっている。また、これらの遺伝子は、プラスミド上に存在し、菌種を越えて広がる事が懸念された。

そこで、過去に国内の医療施設で分離され細菌第二部に保存されていた2,877株について、16S rRNAメチラーゼ遺伝子を保有している株の分離状況を調べた。その結果、既に、国内で緑膿菌から発見されているRmtAの遺伝子(*rmtA*)やRmtB(*rmtB*)を保有する新たな株とともに、海外で報告されているArmAという別種の16S rRNAメチラーゼの遺伝子を保有する株が、複数の菌種において存在する事が、新たに明かとなった。

今後、この種の16S rRNAメチラーゼ遺伝子が、院内感染症、術後感染症、日和見感染症の原因となる種々の臨床分離株にさらに拡散する危険性があり、それを防止する為に調査と監視を継続しつつ、さらに実効ある対策を講じる事が急務となっている。

研究協力者:

山根一和、和知野純一、鈴木里和、柴田尚宏(国立感染症研究所 細菌第二部)

A. 研究目的

アルベカシン(ABK)は日本で開発された半合成アミノグリコシド(AG)系抗生物質で、グラム陽性菌からグラム陰性菌に至るまで幅広い抗菌活性を示すことを特徴としている。日本では、1990年に、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染症の治療薬として認可され、現在臨床現場で広く用いられている。ABKは細菌が産生するアセチル化酵素、リン酸化酵素、アデニル化酵素など種々のAG修飾酵素による耐性化機構を回避することを想定して設計されており、耐性菌が出現しがたい抗生物質といわれてきた。現在までに報告されているABK耐性菌の出現についてはMRSAにおいて、ABKの最小発育阻止濃

度(MIC)が12.5~25 µg/ml、即ち中等度耐性MRSAが数%出現しているという報告がある。この耐性化機構は薬剤のアセチル化とリン酸化を同時に行う二機能酵素によるものであり、ABKの6'位のアミノ基と2''位の水酸基が同時に修飾を受けることにより不活化される。

しかし、1997年にABKのMICが1,024 µg/ml以上を示す超高度耐性緑膿菌が臨床分離された(AR-2株)。また2001年にはセラチアからも同様に高度耐性を有する株(S-95株)が臨床分離された。AR-2株およびS-95株はABK以外の種々のAG系抗生物質にも高度耐性(MIC, >1,024 µg/ml)を示し、薄層クロマトグラフィーでAGの修飾が確認できなかったことから、二機能酵素によるAGの修飾不活化とは異なる全く新規の耐性機構を獲得している可能性が示唆された。院内感染の原因菌である緑膿菌やセラチアでこのような株が臨床現場に広まっている可能性が考え

られ、化学療法の実施において将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。本研究では AR-2 株および S-95 株から ABK 耐性遺伝子をクローニングし、塩基配列の決定および遺伝子産物の機能およびそれを媒介している遺伝子構造を解析した。

B. 研究方法

1. ABK 耐性遺伝子のスクリーニングと PCR による遺伝子の検出および型別

16S rRNA メチラーゼを産生する株は、アルペカシンとともにアミカシン、ゲンタマイシンにも高度耐性を示す事が、これまでの解析で明らかとなっている。そこで、過去に分離され、細菌第二部に保存されていた 2,877 株の緑膿菌、セラチア、大腸菌、肺炎桿菌などの中から、アミカシン、ゲンタマイシンともに耐性(MIC, >32 µg/ml)を示す株を選び、アルペカシンに高度耐性(MIC, >256 µg/ml)を示す株を選択し PCR による遺伝子の検出を試みた。用いた PCR プライマーを、表 1 に示す。

C. 研究結果

RmtA 型の 16S rRNA メチラーゼを産生する緑膿菌が、新たに 5 株発見され。分離施設は、愛知の 2 施設、岐阜、静岡、埼玉の各 1 施設の計 5 施設であった。分離年は 2002 年が 3 株、2003 年が 2 株であった。

RmtB 型の 16S rRNA メチラーゼを産生する株は、新たに 8 株発見された。分離施設は、兵庫、高知、山梨の各 1 施設の計 3 施設であった。分離年は 2001 年が 4 株、2002 年が 2 株、2003 年が 2 株であった。菌種は、*Escherichia coli* 2 株、*Klebsiella pneumoniae* が 4 株、*Klebsiella oxytoca* が 1 株、*Serratia marcescens* が 1 株であった。

ポーランドやフランスなどの欧州で発見された ArmA 型の 16S rRNA メチラーゼを産生する株も、新たに 3 株発見された。分離施設は、兵庫、栃木、神奈川の各 1 施設の計 3 施設であった。分

離年は 3 株総べて 2003 年であった。菌種は、*Escherichia coli* 1 株、*Acinetobacter* 属菌が 1 株、*Serratia marcescens* が 1 株であった。

D. 考察

国内では、これまでに RmtA と RmtB の 2 種類の 16S rRNA methylase 産生株が確認されていたが、今回の調査では、新たに ArmA 型の 16S rRNA methylase 産生株の存在が確認された。ArmA 産生株より抽出したプラスミドの解析を行った結果、ポーランドやフランスから報告された株の *armA* 遺伝子を担う近傍の遺伝子構造も非常に酷似しており、日本で分離された株は、海外から持ち込まれた株である事が強く示唆された。最近、台湾の病院でも *armA* や *rmtB* を保有する *Klebsiella* 属菌や *E. coli* による院内感染が報告されている事実は、この種の耐性菌が、世界的規模で蔓延しはじめた事を示唆している。

アミノ配糖体は家畜の腸炎や乳腺炎の治療薬として広く使われているが、最近スペインの豚由来大腸菌からも *amrA* 遺伝子を保有する株が報告されている。この事実は、病院環境のみならず、畜産現場でも 16S rRNA methylase 産生株を選択する圧力が生じている事を示唆しており、このような耐性株の起源を考える上で興味深い。

E. 結論

本調査研究により、*rmtA* 遺伝子を有する 5 株の緑膿菌が、4 県の 5 箇所の医療施設から、新たに確認された。また、*rmtB* 保有株は、新たに 8 株が確認された。菌種別では、*E. coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Serratia marcescens* など複数の菌種に及んでいた。さらに、これまでに海外でのみ確認されていた *armA* 保有株も新たに 3 株確認され菌種別では、*E. coli*、*Acinetobacter* 属菌、*Serratia marcescens* に及んでいた。

カルバペネムやフルオロキノロンに耐性を獲得したグラム陰性桿菌が各地の医療施設から分

離され、半合成アミノ配糖体は、それらによる感染症の治療薬として重要な位置を占めている。したがって、16S rRNA methylase を産生する株の出現は、化学療法実施の上で将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。また、これらの遺伝子がプラスミド上に存在することから、グラム陰性菌間におけるさらなる伝播拡散の危険性が強く懸念される。

F. 健康危険情報

臨床的に有用なほぼ全てのアミノ配糖体(半合成アミノグリコシドを含む)に対し、放線菌並みの超高度耐性を付与する 16S rRNA methylase を産生するグラム陰性桿菌が、我が国の医療現場で臨床分離された複数の菌種に及んでいる事が確認された。

海外では、最近この種の耐性株が豚から分離された大腸菌においても確認されている。畜産現場では家畜の腸炎や乳腺炎などの治療の為、カナマイシンなどのアミノグリコシドが広く用いられている事から、この種の耐性菌が畜産環境で発生し人の医療環境に侵入している可能性もあり、食の安全を確保する上でも、検疫所、屠畜場、食肉衛生検査所などにおいて、食肉付着菌のアミノ配糖体耐性に関する早急な調査が必要と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Yokoyama, Y. Doi, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, H. Kato, Y. Arakawa. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003; 362: 1888-1993.
2. Y. Doi, K. Yokoyama, K. Yamane, J. Wachino, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring

high-level resistance to aminoglycoside. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 491-496.

3. Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):2069-74.
 4. Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y, Coming Clinical Threat: Worldwide Spread of 16S rRNA Methylase-producing Gram-negative Bacilli, *Emerg. Infect. Dis.* 2005, 印刷中
- ### 2. 学会発表
1. K. Yamane, Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, N. Shibata, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa: Genetic environment of 16S Ribosomal RNA Methylase (*magrA*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* conferring Resistance to Aminoglycosides. American Society for Microbiology 103rd General Meeting, Washington DC, USA, May, 2003
 2. J. Wachino, K. Yamane, H. Kurokawa, S. Suzuki, N. Shibata, Y. Arakawa. Global transmission of the 16S rRNA methylase gene *armA* among clinically isolated Gram-negative rods, 44th ICCAC Washington DC 2004/10/30-11/2
 3. K. Yamane, J. Wachino, Y. Doi, K. Yokoyama, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, H. Kato, T. Yagi, K. Kai, Y. Arakawa : Molecular Typing of 16S rRNA Methylase Genes Among Highly-Aminoglycoside Resistance Gram-Negative Bacilli Isolated in Japanese Hospital. American Society for Microbiology 104rd General Meeting, May, 2004, New Orleans, USA

4. 山根一和、和知野純一、鈴木里和、柴田尚宏、荒川宜親：グラム陰性桿菌にアミノグリコシド高度耐性を付与する 16S rRNA メチラーゼの型別と臨床分離株の保有調査
第 16 回日本臨床微生物学会総会 2005 年 2 月 京都
5. 山根一和、土井洋平、和知野純一、八木哲也、柴田尚宏、柴山恵吾、加藤はる、荒川宜親：グラム陰性桿菌に高度アミノグリコシド耐性を付与する 16S rRNA methylase の保有状況 第 86 回日本細菌学会関東支部会、横浜、10 月、2003 年

H. 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

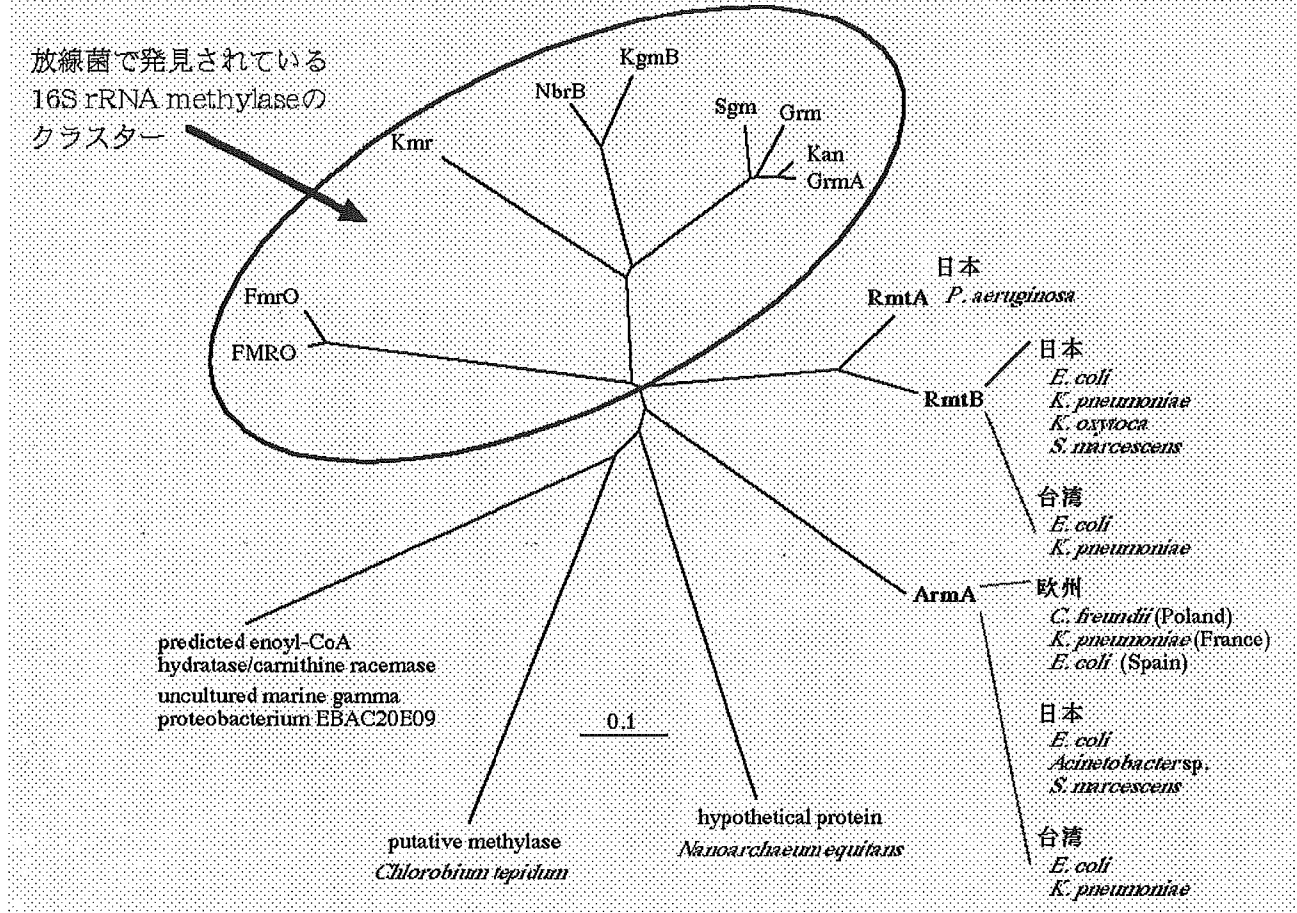
表 1 3種類の 16S rRNA methylase の遺伝子を検出する PCR プライマー

<i>rmtA</i>	forward	5'-CTA GTG TCC ATC CTT TCC TC-3'
	reverse	5'-TTT GTC TCC AGT CCC TTG CC-3'
<i>rmtB</i>	forward	5'-CCC AAA CAG ACC GTA GAG GC-3'
	reverse	5'-CTC AAA CTC GGC GGG CAA GC-3'
<i>armA</i>	forward	5'-AGG TTG TTT CCA TTT CTG AG-3'
	reverse	5'-TCT CTT CCA TTC CCT TCT CC-3'

表 2 *Lancet* に報告された後に新たに確認された 16S rRNA methylase 産生株

Species & strain	Type	Isolation	Hospital	Prefecture
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P122	RmtA	2002	A	Aichi
<i>P. aeruginosa</i> P340	RmtA	2002	B	Gifu
<i>P. aeruginosa</i> 02-386	RmtA	2002	C	Saitama
<i>P. aeruginosa</i> 03-29	RmtA	2003	D	Aichi
<i>P. aeruginosa</i> 03-230	RmtA	2003	E	Shizuoka
<i>E. coli</i> 01-139	RmtB	2001	H	Yamanashi
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 01-140	RmtB	2001	H	Yamanashi
<i>Klebsiella oxytoca</i> 01-141	RmtB	2001	H	Yamanashi
<i>K. pneumoniae</i> 01-142	RmtB	2001	H	Yamanashi
<i>Escherichia coli</i> C316	RmtB	2002	F	Hyogo
<i>Serratia marcescens</i> S95	RmtB	2002	G	Kohchi
<i>K. pneumoniae</i> 03-252	RmtB	2003	H	Yamanashi
<i>K. pneumoniae</i> 03-518	RmtB	2003	H	Yamanashi
<i>E. coli</i> C316-2	ArmA	2003	F	Hyogo
<i>S. marcescens</i> ARS8	ArmA	2003	I	Tochigi
<i>Acinetobacter</i> sp. ARS6	ArmA	2003	J	Kanagawa

図1. アミノグリコシド超高度耐性を付与する16S rRNA メチラーゼの遺伝的関連



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

- ボロン酸化合物を用いた class C β -lactamase(AmpC)型産生菌の簡易検出法の開発 -

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

β -ラクタマーゼはその構造上の特徴から、class A、B、C、Dの4つのグループに別れ、我々はこれまでに臨床上問題となっている class A の基質拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)の簡易検出法として Twin test を、class B のメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の検出法として SMA 法を開発し、臨床現場に広く普及させるに至っている。class C β -ラクタマーゼ産生菌の検出法に関しては、抗菌薬による誘導性を観察する方法や、菌体より抽出した粗酵素液を用いた3次元法などが報告されているが、判定法や方法の簡便さ平明さにおいて難があり、臨床現場で実施するのは困難である。そこで我々は、ボロン酸化合物が class C β -ラクタマーゼに比較的特異性の高い阻害剤であることを利用し、臨床現場で実施可能な class C β -ラクタマーゼ産生菌の簡易検出法の開発を試みた。その結果、3-アミノフェニルボロン酸(APB)を class C β -ラクタマーゼ特異的阻害剤として利用することで、DISK 拡散法、MIC 法の両試験法において、class C β -ラクタマーゼ産生菌を特異的に検出することができた。

我々が開発した検出法は臨床上問題となる感染症を引き起こす薬剤耐性菌の中から簡易かつ安価に class C β -ラクタマーゼ産生菌を検出できる。本検査法を我々が過去に報告した Twin test、SMA test とともに併用すれば、PCR 等の高価な試験法を行わずとも細菌検査室において β -ラクタマーゼのクラスの推定が可能となる。

研究協力者：

和知野純一、八木哲也、柴田尚宏、山根一和、鈴木里和、土井洋平、柴山恵吾、加藤はる、甲斐久美子、横川滋子(国立感染症研究所 細菌第二部)

A. 研究目的

Class C β -ラクタマーゼ(以下 AmpC- β -ラクタマーゼ)は *Pseudomonas aeruginosa*、*Enterobacter spp.*、*Citrobacter freundii*、*Escherichia coli* など院内感染の原因菌となることの多い菌種の染色体上にあるものや、未だ報告例は少ないが伝達性のプラスミド上に存在するものがある。プラスミド性 AmpC- β -ラクタマーゼに関しては、1991年に堀井らが臨床分離 *K.*

*pneumoniae*より初めて MOX-1を発見して以来、国内においては CMY-9産生 *E. coli*や CFE-1産生 *E. coli*など散発的に報告されている。

これらプラスミド性 AmpC- β -ラクタマーゼは臨床上有用なセフトラジジム(CAZ)、セフトキシム(CTX)といった β -ラクタム薬を分解するため、細菌検査室としてはこれらを産生する菌を迅速に特定し、抗菌薬治療に関する指針や院内感染の防止に有用な情報を発信していくことが肝要である。しかし、現在までに細菌検査室において実施可能なプラスミド性 AmpC- β -ラクタマーゼ産生菌の検出法は構築されるに至っていない。

そこで我々は、ボロン酸化合物が AmpC- β -ラクタマーゼに比較的特異性の高い阻害剤である

ことを利用し、臨床現場で実施可能なプラスミド性 AmpC-β-ラクタマーゼ産生菌の簡易検出法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 試験に用いた菌株

基質拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)、メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)、AmpC-β-ラクタマーゼをプラスミド性に産生する *E. coli*、*K. pneumoniae*、計 49 株及び染色体性の AmpC-β-ラクタマーゼを産生する *Enterobacter cloacae*、*Citrobacter freundii*、*Serratia marcescens*、*Pseudomonas aeruginosa* の各臨床分離株(Table 1)

2. 試験に用いたβ-ラクタマーゼ阻害剤

AmpC-β-ラクタマーゼ阻害剤として 3 種類のボロン酸化合物(3-アミノフェニルボロン酸、3-ニトロフェニルボロン酸、2-チオフェンボロン酸)について検討した。また、ESBL の阻害剤としてクラブラン酸、MBL の阻害剤としてメルカプト酢酸ナトリウムを使用した。

3. 試験法

1)被検菌を MH 培地に塗布し、ボロン酸化合物を含む disk と CAZ-disk を Fig 1.のように置き、一晚培養後、発育阻止帯の形状変化を観察した。

2)CAZ-disk を 2 枚配置し、一方にボロン酸化合物を含ませ(Fig 1.)、培養後の発育阻止帯の拡張を観察した。

3)NCCLS の推奨する微量液体希釈法に従い MIC を測定する際に、阻害剤としてボロン酸化合物を添加し MIC の変化を観察した。

C. 研究結果

本試験法では AmpC-β-ラクタマーゼ阻害剤としてボロン酸化合物 3 種類について検討を行ったが、3-ニトロフェニルボロン酸、2-チオフェンボロン酸についてはそれ自体に強い抗菌活性が確認されたため、阻害剤としては不相当であると考えられた。よって 3-アミノフェニルボロン酸を

阻害剤として使用し、各種試験法の検討を行った。その結果、試験法 1)では AmpC-β-ラクタマーゼ産生株のみ阻止帯の形状変化を示し、これらの変化は ESBL や MBL 産生株では確認されなかった(Fig.1C)。しかし、AmpC-β-ラクタマーゼ、ESBL の両方を産生する株では、その阻害効果は明瞭ではなく、判定に注意を要すると考えられた(Fig.1C)。Fig. 1D の結果より本試験法は *E. cloacae*、*C. freundii*、*S. marcescens*、*P. aeruginosa* など染色体性の AmpC-β-ラクタマーゼ産生株の検出にも応用可能であった。

また、試験法 2)においても AmpC-β-ラクタマーゼ産生株のみ阻止帯の拡大(5mm 以上)が確認され、他のβ-ラクタマーゼを産生する株にこれらの変化は見られなかった。試験法 1)の結果と同様に AmpC-β-ラクタマーゼ、ESBL の両方を産生する株においてはその阻害効果は明瞭ではなかった。

本阻害剤を微量液体希釈法に応用した場合、MIC の低下は AmpC-β-ラクタマーゼ産生株のみに見られ(3 管以上)、他のβ-ラクタマーゼを産生する株では MIC の低下は見られなかった(Table. 1, Fig. 4)。本阻害剤をクラブラン酸、メルカプト酢酸ナトリウムとともに使用する事で ESBL、MBL、AmpC-β-ラクタマーゼ産生株をそれぞれ容易に区別することが可能であった(Fig.4)。

D. 考察

ボロン酸化合物が AmpC-β-ラクタマーゼ特異的阻害剤であることを利用し、我々は細菌検査室で実施可能な AmpC-β-ラクタマーゼ産生菌検出法として 3 種類の試験法を考案した。いずれの方法も *E. coli*、*K. pneumoniae* の産生するプラスミド性 AmpC-β-ラクタマーゼを特異的に検出することが可能であった。しかし、AmpC-β-ラクタマーゼ、ESBL を両方産生する株においては、その阻害効果は明瞭でなく、判定が困難であった。その理由として、このような株はボロン酸化合物

により AmpC- β -ラクタマーゼを阻害されても、ESBL により抗菌薬分解能を維持できるためと考えられる。

プラスミド性 AmpC- β -ラクタマーゼ産生株の国内での分離率は ESBL や MBL 産生株に比べて極めて低いと考えられているが、その正確な動向は未だ不明である。その一因として ESBL や MBL 産生株に比べ、AmpC β -ラクタマーゼ産生株の簡易検出法の構築が遅れたことが挙げられる。本試験法は、これらの動向調査を行う際のスクリーニング法としての使用が期待される。また、本試験法を我々が過去に報告した Twin test、SMA test と併用することで PCR 等の高価な試験法を行わずとも細菌検査室において β -ラクタマーゼの class 分類が可能となり、細菌検査室より院内での抗菌薬耐性菌の監視、適正抗菌薬に対する指針に役立つ情報が供給されることが期待される。

E. 結論

本研究により、細菌検査室で実施可能な AmpC- β -ラクタマーゼ産生菌の検出法が構築された。院内感染症や術後感染症の原因菌である大腸菌や肺炎桿菌において臨床現場で使用頻度が高いセファマイシンや広域セファロsporin に対し高度耐性を付与する、AmpC- β -ラクタマーゼ産生能力を獲得した臨床分離菌の出現は、化学療法実施の上で将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。

細菌検査室としてはこれらの細菌を迅速に特定し、抗菌薬治療に関する指針や院内感染の防止に役立つ情報を発信していくことが極めて肝要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. Practical Methods for Identification of Class C β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Using Boronic Acid Compounds. *J Clin Microbiol.* 2005. in press.

2. 学会発表

1. ボロン酸化合物を用いた class C β -ラクタマーゼ産生菌の簡易検出法の開発, 和知野純一、八木哲也、黒川博史、柴田尚宏、山根一和、鈴木里和、池、康嘉、荒川宜親、日本臨床微生物学会, 2005.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願中 (特願 2003-416165)
2. 実用新案登録、その他

図1 ポロン酸化合物を含んだ disk によるクラス C 型β-ラクタマーゼの産生性の検討

FIG. 1.

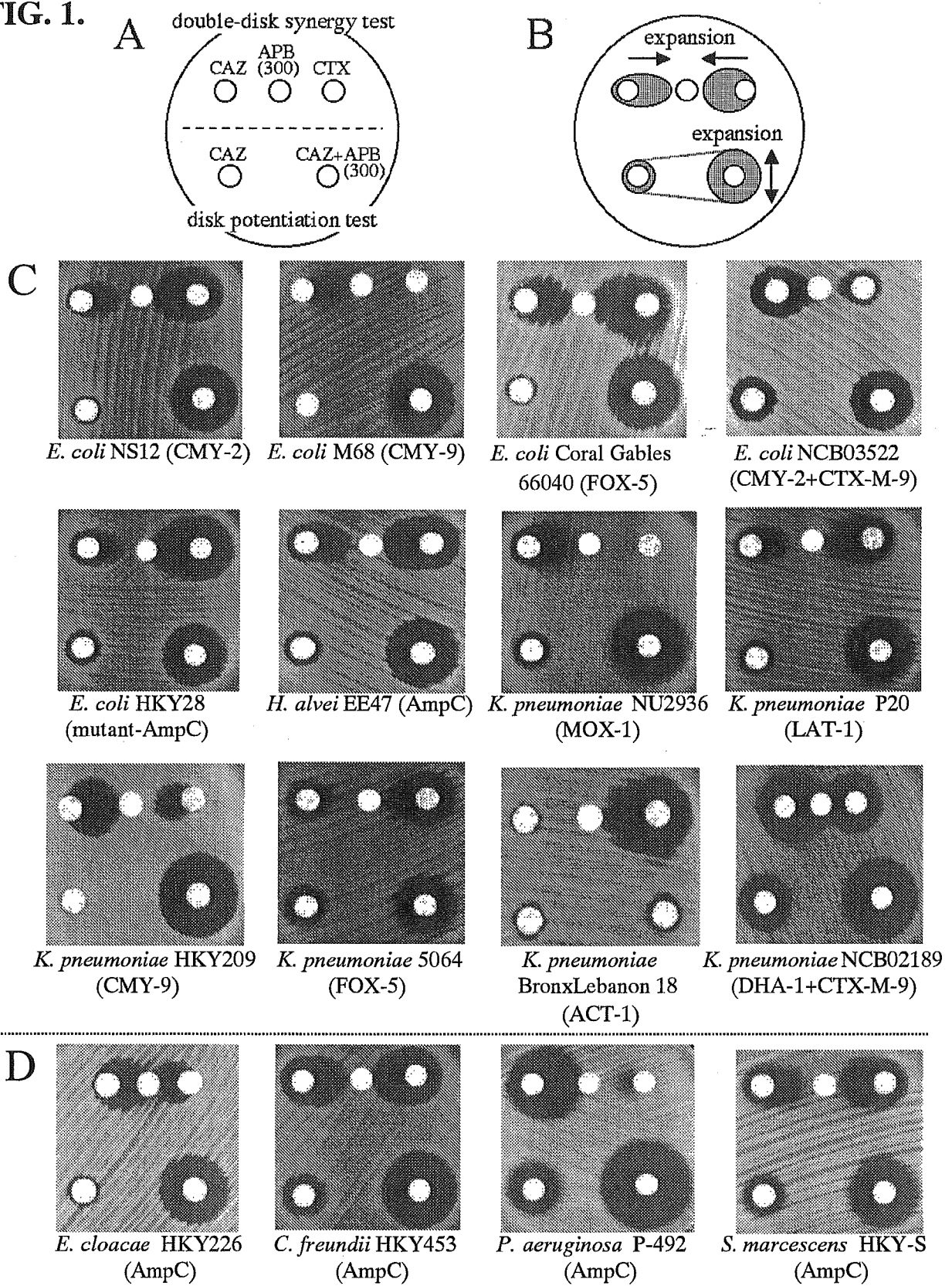


図2 クラスC以外のβ-ラクタマーゼ産生株では、ボロン酸化合物の影響は見られない

FIG. 2.

