

(10). In most strains, the acquired fluoroquinolone resistance was attributed to mutations in the genes encoding DNA gyrase (GyrA, GyrB) (18, 30-32) or DNA topoisomerase IV (ParC, ParE) (12, 13). We analyzed the association of quinolone resistance with mutations in the genes coding for gyrase and topoisomerase IV of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A, which are especially clinically important serotypes of *Salmonella* spp.

**The point mutations in *gyrA* and *parC* of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility to fluoroquinolones.**

We determined *gyrA* and *parC* mutation of several strains with resistant to fluoroquinolones or decreased susceptibility to fluoroquinolones (8). The strains resistant to fluoroquinolones were obtained from experimentally selection in vitro. The data are shown in Table 3. The *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A clinical isolates with decreased susceptibility to fluoroquinolone had only a single mutation in the *gyrA* gene, at either position 83 or 87 of GyrA. The strains with high-level resistance to fluoroquinolones induced by in vitro selection with ciprofloxacin had double mutations in the *gyrA* gene at both position 83 and position 87 of GyrA (Table 3). Only one *S. enterica* serovar Paratyphi A strain (strain NIHP3-1 in Table 3) had a mutation in the *parC* gene, at Glu-84 of ParC, in addition to double mutations in the *gyrA* gene. For the *parC* gene, the mutation was a change of GAA (Glu) to AAA (Lys) at codon 84. Alterations in the quinolone resistance determining regions (QRDRs) of the *gyrB* and *parE* genes were not found in any of the strains tested. These findings indicate that *gyrA* mutations are of principal

importance for the fluoroquinolone resistance of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. Alterations at position 83 or 87 of the GyrA amino acid sequence have been described previously for *Salmonella* strains. Double mutations at positions 83 and 87 of the GyrA amino acid sequence were also reported in clinical isolates of *S. enterica* serovar Schwarzengrund, which caused nosocomial infections in the United States and which exhibited ciprofloxacin resistance (19). Although strains with high-level fluoroquinolone resistance due to double mutations at codons 83 and 87 in the GyrA amino acid sequence have not been found in clinical isolates of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A, several cases of the failure of treatment for typhoid fever due to strains with decreased susceptibilities to fluoroquinolones have been reported. Since we obtained isolates with double mutations in the *gyrA* gene by in vitro selection and a mutation in *parC* caused by a novel substitution in Lys-84, such mutations in clinical isolates of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A may appear in the future. Establishment of a surveillance system for the detection of *gyrA* mutations will be important for the detection of fluoroquinolone resistance in *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A.

**PCR-RFLP for screening *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with decreased susceptibility to fluoroquinolones.**

The alterations at the codon Ser-83 and Asp-87 of GyrA are the most frequently found in the clinical isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones in *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A (2, 8, 28). We previously reported that only *gyrA* mutations contribute the fluoroquinolone resistance in *S.*

Table 3. The results of RFLP patterns, MICs and *gyrA* mutations of each strains.

Serovar	Strain No.	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		<i>gyrA</i> <sup>3)</sup>		RFLP-pattern <sup>4)</sup>
		CPFX <sup>1)</sup>	NA <sup>1)</sup>	83 TCC (Ser)	87 GAC (Asp)	
Typhi	NIHP3-4 <sup>2)</sup>	>32	>256	TTC (Phe)	TAC (Tyr)	A
Paratyphi A	NIHP3-1 <sup>2)</sup>	>32	>256	TTC (Phe)	AAC (Asn)	A
Typhi	NIHP3-43 <sup>2)</sup>	16	>256	TTC (Phe)	TAC (Tyr)	A
Typhi	NIHP3-39 <sup>2)</sup>	8	>256	TTC (Phe)	TAC (Tyr)	A
Paratyphi A	NIHP3-44 <sup>2)</sup>	8	>256	TTC (Phe)	TAC (Tyr)	A
Paratyphi A	NIHP3-3 <sup>2)</sup>	8	>256	TTC (Phe)	TAC (Tyr)	A
Paratyphi A	NIHP3-41 <sup>2)</sup>	8	>256	TTC (Phe)	TAC (Tyr)	A
Paratyphi A	950040	2	>256	TTC (Phe)	None	B
Typhi	000006	0.5	>256	TAC (Tyr)	None	B
Typhi	000015	0.5	>256	None	GGC (Gly)	C
Typhi	000016	0.5	>256	TAC (Tyr)	None	B
Typhi	000019	0.5	>256	TAC (Tyr)	None	B
Typhi	000022	0.5	>256	TAC (Tyr)	None	B
Paratyphi A	990112	0.5	>256	TTC (Phe)	None	B
Paratyphi A	990110	0.5	>256	TTC (Phe)	None	B
Paratyphi A	000040	0.5	>256	TTC (Phe)	None	B
Paratyphi A	000055	0.5	>256	TTC (Phe)	None	B
Paratyphi A	990021	0.5	>256	TTC (Phe)	None	B
Paratyphi A	980043	0.5	>256	TTC (Phe)	None	B
Typhi	990018	0.25	>256	TTC (Phe)	None	B
Typhi	990120	0.25	>256	TTC (Phe)	None	B
Typhi	990020	0.25	>256	None	GGC (Gly)	C
Typhi	990104	0.25	64	TTC (Phe)	None	B
Typhi	000015	0.25	64	None	TAC (Tyr)	C
Typhi	000027	0.25	64	None	TAC (Tyr)	C
Typhi	000037	0.25	64	None	TAC (Tyr)	C
Paratyphi A	970131	0.032	4	None	None	D
Paratyphi A	000066	0.016	4	None	None	D
Paratyphi A	990118	0.064	2	None	None	D
Typhi	990100	0.032	2	None	None	D
Typhi	990113	0.016	2	None	None	D
Typhi	010053	0.016	2	None	None	D
Typhi	010063	0.016	2	None	None	D
Paratyphi A	010044	0.032	1	None	None	D

1) CPFX; ciprofloxacin, NA; nalidixic acid

2) mutants experimentally selected in vitro.

3) None; no mutations were found.

4) The digested patterns in Fig. 1.

*enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. Any *gyrB*, *parC* and *parE* mutations which are responsible for the fluoroquinolone resistance were not found in the clinical isolates of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A (8). The susceptibility test by disk diffusion test

with nalidixic acid disk is now employed for the screen for the strain with reduced susceptibility to fluoroquinolones. However, alternate DNA-based method is required for the rapid screening for the strains with reduced

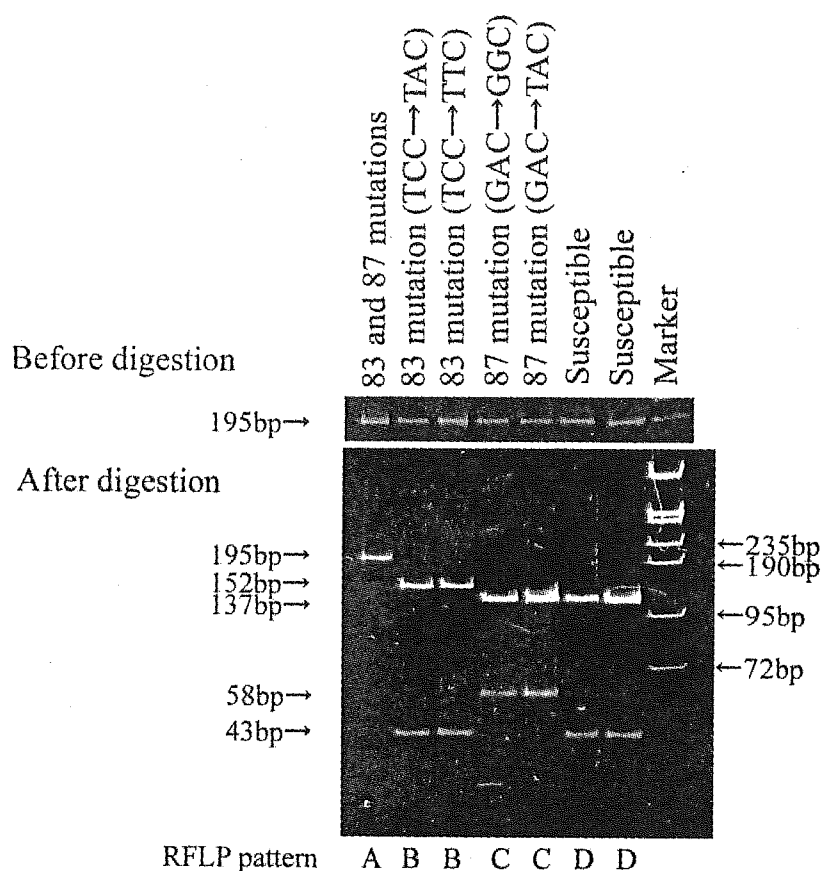


Fig. 3 PCR-RFLP patterns of the representative strains after *HinfI* digestion. The digested PCR products were separated by 15% polyacrylamide<sup>1</sup> gel electrophoresis.

Table 4. Primers used for PCR-RFLP.

Primers	Sequence	primer position <sup>1)</sup>
gyrA-F	5'- TGT CCG AGA TGG CCT GAA GC	-3' 108-127
gyrA-HinfI-as	5'- ATG TAA CGC AGC GAG AAT GGC TGC GCC ATA CGA ACG CTG GA* <sup>2)</sup> G	-3' 302-261

1) The primer positions were indicated by the number of nucleotide sequences from the start codon of *gyrA* gene.

2) The mismatch sequence to produce a *HinfI* site into the amplified fragment is indicated by asterisk on the primer of *gyrA-HinfI-as*

susceptibility to fluoroquinolones. The purpose of this study is to develop more rapid screening method for the detection of fluoroquinolone resistant strains and reduced susceptibility strains than the ordinary culture method.

We designed the PCR-RFLP to detect

common mutations related to fluoroquinolone resistance at codon 83 and 87 of *GyrA*. The PCR was performed with the primers, *gyrA-F* and *gyrA-HinfI-as*, which are expected to produce a 195-bp amplified fragment with a *HinfI* restriction site at the codon corresponding to

Ser-83 of GyrA (Table 4). The reverse primer gyrA-HinI-as, whose sequence is different by one base from the original gene sequence, introduced an artificial *HinI* cleavage site at Asp-87 codon of GyrA according to the primer-specified restriction site modification method. Restriction enzyme digestions were performed in a total of 20  $\mu$ l of the mixture containing 10  $\mu$ l of PCR product, 2  $\mu$ l of 10x digestion buffer and 5U of *HinI* for 60 min. incubation at 37°C. The digested PCR products were separated in 15% polyacrylamide gel electrophoresis.

The alterations of the *gyrA* gene have a major role in the fluoroquinolone resistance of gram negative bacteria among the mechanisms of quinolone resistance. Our data in previous study showed that only the strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones were found in the clinical isolates, and that the typical resistant strains (minimum inhibitory concentration (MIC) of ciprofloxacin;  $\geq 4$   $\mu$ g/ml) were never found in the clinical isolates (8, 10). We determined the *gyrA* mutations of more than 100 strains of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A with reduced susceptibility to fluoroquinolones. *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A clinical isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones had only a single mutation in the *gyrA* gene at the position of either 83 or 87 of GyrA, and other *gyrA* mutations were never found in the clinical isolates of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. The alterations in the QRDR of the *gyrB* and *parE* genes were not found in all of the strain tested (8). Our findings clearly showed that only *gyrA* mutations were involved in the fluoroquinolone resistance of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A, and also support that *gyrA* mutations are principally important for the *S.*

*enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A fluoroquinolone resistance. Therefore, the screening of *gyrA* mutations is considered to be a necessary and sufficient for the screening of the strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones in *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A.

A fragment including *gyrA* QRDR was amplified by PCR with the primers gyrA-F and gyrA-HinI-as (Table 4). The size of the amplified fragment was 195 bp, which is the same in all *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A strains tested. After *HinI* digestion, the cleaved fragments of the susceptible strains of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A consisted of 3 bands (137, 43 and 15 bp; RFLP pattern D in Fig.3), which was produced by the *HinI* sites at the nucleotide sequences corresponding to Ser-83 and Asp-87 of GyrA. The 15 bp-smallest fragment, which was produced by the cleavage between Ser-83 and Asp-87 of GyrA, was invisible in Fig.3, however, it is easy to be differentiated from the other types. The digested fragment of the strains which have a mutation in codon Ser-83 of GyrA consists of 2 bands (152 and 43 bp; RFLP pattern B in Fig.3), which lost the *HinI* site corresponding to the Ser-83 of GyrA. The PCR fragment of the strains which have a mutation in codon Asp-87 of GyrA consists of 2 bands (137 and 58 bp; RFLP pattern C in Fig. 3). The fragment of the strains which have mutations in both Ser-83 and Asp-87 were not digested by *HinI* restriction enzyme due to the point mutations at the both sites, and the fragment size did not change after the digestion with *HinI* (RFLP pattern A in Fig.3). We examined with this method several strains of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A, which include fluoroquinolone resistant strains, the strains with

reduced susceptibility to fluoroquinolone, and fluoroquinolone susceptible strains, and we successfully screened the strains with reduced susceptibility to fluoroquinolones by this method (Table 3). Establishment of surveillance system for the detection of *gyrA* mutations will be the most important to find out the fluoroquinolone resistance of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. PCR-RFLP method described here may be one of methods for the rapid detection of such mutations.

### Conclusions

The surveillance for antimicrobial resistance of *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A should be continued. Particularly monitoring the emergence of strains with double mutations in the *gyrA* genes, that are fully resistant to fluoroquinolones, is important for the antimicrobial resistance surveillance of clinically important *S. enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A.

In conclusion, PCR diagnosis method for typhoid fever and paratyphoid fever and PCR-RFLP for screening for *gyrA* mutations, that are described here, may make it possible to get earlier diagnosis and earlier screening for fluoroquinolone resistance.

### References

1. Asperilla, M. O., R. A. Smego, Jr., and L. K. Scott. 1990. Quinolone antibiotics in the treatment of *Salmonella* infections. *Rev. Infect. Dis.* 12:873-889.
2. Brown, J. C., P. M. Shanahan, M. V. Jesudason, C. J. Thomson, and S. G. Amyes. 1996. Mutations responsible for reduced susceptibility to 4-quinolones in clinical isolates of multi-resistant *Salmonella typhi* in India. *J. Antimicrob. Chemother.* 37:891-900.
3. Cao, X. T., R. Kneen, T. A. Nguyen, D. L. Truong, N. J. White, and C. M. Parry. 1999. A comparative study of ofloxacin and cefixime for treatment of typhoid fever in children. The Dong Nai Pediatric Center Typhoid Study Group. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18:245-8.
4. Chitnis, V., D. Chitnis, S. Verma, and N. Hemvani. 1999. Multidrug-resistant *Salmonella typhi* in India. *Lancet* 354:514-515.
5. Eykyn, S. J., and H. Williams. 1987. Treatment of multiresistant *Salmonella typhi* with oral ciprofloxacin. *Lancet* 2:1407-1408.
6. Frankel, G., S. M. Newton, G. K. Schoolnik, and B. A. Stocker. 1989. Intragenic recombination in a flagellin gene: characterization of the H1-j gene of *Salmonella typhi*. *EMBO J* 8:3149-3152.
7. Hashimoto, Y., Y. Itho, Y. Fujinaga, A. Q. Khan, F. Sultana, M. Miyake, K. Hirose, H. Yamamoto, and T. Ezaki. 1995. Development of nested PCR based on the *ViaB* sequence to detect *Salmonella typhi*. *J. Clin. Microbiol.* 33:775-777.
8. Hirose, K., A. Hashimoto, K. Tamura, Y. Kawamura, T. Ezaki, H. Sagara, and H. Watanabe. 2002. DNA sequence analysis of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV quinolone resistance-determining regions of *Salmonella enterica* serovar Typhi and serovar Paratyphi A. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3249-3252.
9. Hirose, K., K. Itoh, H. Nakajima, T.

- Kurazono, M. Yamaguchi, K. Moriya, T. Ezaki, Y. Kawamura, K. Tamura, and H. Watanabe. 2002. Selective amplification of *tyv* (*rfbE*), *pri* (*rfbS*), *viaB*, and *fliC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *J Clin Microbiol* 40:633-636.
10. Hirose, K., K. Tamura, H. Sagara, and H. Watanabe. 2001. Antibiotic susceptibilities of *Salmonella enterica* serovar Typhi and *S. enterica* serovar Paratyphi A isolated from patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:956-958.
  11. Kapil, A., S. Sood, N. R. Dash, B. K. Das, and P. Seth. 1999. Ciprofloxacin in typhoid fever. *Lancet* 354:164.
  12. Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki. 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63:393-404.
  13. Kato, J., H. Suzuki, and H. Ikeda. 1992. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267:25676-25684.
  14. Kauffman, F. 1936. Uber die diphasische Natur der Typhusbacillen. *Z. Hyg.* 119:103-118.
  15. Mehta, A., C. Rodrigues, and V. R. Joshi. 1992. Multiresistant *Salmonella* organisms in India. *Jama* 267:1614.
  16. Mermin, J. H., R. Villar, J. Carpenter, L. Roberts, A. Samariddin, L. Gasanova, S. Lomakina, C. Bopp, L. Hutwagner, P. Mead, B. Ross, and E. D. Mintz. 1999. A massive epidemic of multidrug-resistant typhoid fever in Tajikistan associated with consumption of municipal water. *J. Infect. Dis.* 179:1416-1422.
  17. Murdoch, D. A., N. Banatvaia, A. Bone, B. I. Shoismatulloev, L. R. Ward, E. J. Threlfall, and N. A. Banatvala. 1998. Epidemic ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhi* in Tajikistan. *Lancet* 351:339.
  18. Nakamura, S., M. Nakamura, T. Kojima, and H. Yoshida. 1989. *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:254-255.
  19. Olsen, S. J., E. E. DeBess, T. E. McGivern, N. Marano, T. Eby, S. Mauvais, V. K. Balan, G. Zirnstein, P. R. Cieslak, and F. J. Angulo. 2001. A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant salmonella infection. *N. Engl. J. Med.* 344:1572-1579.
  20. Panigrahi, D., P. Roy, and R. Sehgal. 1991. Ciprofloxacin for typhoid fever. *Lancet* 338:1601.
  21. Parry, C., J. Wain, N. T. Chinh, H.

- Vinh, and J. J. Farrar. 1998. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Vietnam. *Lancet* 351:1289.
22. Rao, P. S., V. Rajashekar, G. K. Varghese, and P. G. Shivananda. 1993. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella typhi* in rural southern India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48:108-111.
23. Rowe, B., L. R. Ward, and E. J. Threlfall. 1995. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhi* in the UK. *Lancet* 346:1302.
24. Rowe, B., L. R. Ward, and E. J. Threlfall. 1991. Treatment of multiresistant typhoid fever. *Lancet* 337:1422.
25. Song, J. H., H. Cho, M. Y. Park, D. S. Na, H. B. Moon, and C. H. Pai. 1993. Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31:1439-1443.
26. Threlfall, E. J., L. R. Ward, B. Rowe, S. Raghupathi, V. Chandrasekaran, J. Vandepitte, and P. Lemmens. 1992. Widespread occurrence of multiple drug-resistant *Salmonella typhi* in India. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:990-993.
27. Threlfall, E. J., L. R. Ward, J. A. Skinner, H. R. Smith, and S. Lacey. 1999. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella typhi* and treatment failure. *Lancet* 353:1590-1591.
28. Wain, J., N. T. Hoa, N. T. Chinh, H. Vinh, M. J. Everett, T. S. Diep, N. P. Day, T. Solomon, N. J. White, L. J. Piddock, and C. M. Parry. 1997. Quinolone-resistant *Salmonella typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin. Infect. Dis.* 25:1404-1410.
29. Wang, F., X. J. Gu, M. F. Zhang, and T. Y. Tai. 1989. Treatment of typhoid fever with ofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 23:785-788.
30. Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, and S. Nakamura. 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1271-1272.
31. Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka, and S. Nakamura. 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1647-1650.
32. Yoshida, H., T. Kojima, J. Yamagishi, and S. Nakamura. 1988. Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 211:1-7.
33. Zhu, Q., C. K. Lim, and Y. N. Chan. 1996. Detection of *Salmonella typhi* by polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* 80:244-251.

平成15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16(2004)年 4月

主任研究者 池 康嘉



平成15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
	後藤 正文	熊本大学 大学院医学薬学研究部 構造機能物理化学	教授
	後藤 直正	京都薬科大学 薬学部 微生物学	助教授
	堀田 國元	国立感染症研究所 生物活性物質部	室長
	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	
	石綿 司	同上	
	浦部 優子	同上	
	麻 興華	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	
	横山 佳子	国立感染症研究所 細菌第二部	
	土井 洋平	同上	
	山根 一和	同上	
	柴田 尚宏	同上	
	八木 哲也	同上	
	柴山 恵吾	同上	
	加藤 はる	同上	
	和知野 純一	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
小林 玲子	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
諸角 美由紀	同上
長谷川 恵子	同上
千葉 菜穂子	同上
鈴木 悦子	同上
砂川 慶介	北里大学 医学部 感染症学講座
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
山口 佳宏	同上
村田 健	京都薬科大学 薬学部 微生物学
西野 武志	同上
石野 敬子	国立感染症研究所 生物活性物質部
石川 淳	同上
土崎 尚史	同上
木村 聡一郎	東邦大学 医学部 微生物学講座
石井 良和	同上
内村 眞佐子	千葉県衛生研究所
依田 清江	同上
泉谷 秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
廣瀬 健二	同上
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  
迅速・簡便検出法に関する研究 ----- 1  
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 ----- 18  
荒川 宜親 (国立感染症研究所 細菌第二部)
2. 国内で分離されたメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの遺伝型別 ----- 29  
荒川 宜親 (国立感染症研究所 細菌第二部)
3. 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 ----- 40  
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)
4. 日本初のVRE院内感染症株から分離されたバンコマイシン耐性 ----- 49  
プラスミドの解析  
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.  $\beta$ -ラクタム系薬高度耐性化に関与する調節遺伝子の同定と診断法の研究 ----- 58  
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による原因菌の ----- 66  
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 ----- 76  
後藤 正文 (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. 臨床分離緑膿菌の多剤耐性化に機能する排出システムの性状解析 ----- 94  
後藤 直正 (京都薬科大学薬学部 微生物学教室)
9. アミノグリコシド耐性菌のレファレンス因子の特定と ----- 99  
迅速簡便検出法に関する研究  
堀田 国元 (国立感染症研究所 生物活性物質部)

10. AmpC 大量産生株における ESBL の検出方法の確立 -----	106
山口 恵三 (東邦大学 医学部 微生物学講座)	
11. サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学 -----	111
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)	
12. PCR-RFLP法を利用したニューキノロン低感受性 -----	116
チフス菌・パラチフスA菌の <i>gyrA</i> 変異のスクリーニング法の検討	
渡辺 治雄 (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15年度）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

15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）

**研究要旨** 2001年1月より2002年12月に国内の医療施設で分離された、 $\beta$ -ラクタム薬耐性株におけるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ（metallo- $\beta$ -lactamase, MBL）MBLの産生状況やその遺伝子型別を調べた。調べた菌株は $\beta$ -ラクタム剤耐性として分離されたグラム陰性菌978株である。978株の中で第3世代セフェムのセフトジジムとスルペラゾンに高度耐性の578株について解析を行った。メルカプト酢酸ナトリウム（SMA）による阻害試験（MBL簡便検出方法）の結果、587株431株が陽性であった。431株について、各種MBLに特異的なプライマーを用いてMBL型を検査した結果、431株すべてについてMBL遺伝子が検出できた。MBLの産生性を獲得した菌種としては、*Pseudomonas aeruginosa*（緑膿菌）、*Pseudomonas ptida/fluorescens*などが多く、その他、*Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia*などのブドウ糖非発酵菌でMBL産生菌が多い傾向が見られた。【荒川】

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が分離された。ABK耐性に関与する遺伝子をクローニングし解析を行った。その結果、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判明した（緑膿菌の耐性遺伝子を *rmtA*、セラチア菌の耐性遺伝子を *rmtB* と名づけた）。また接合実験の結果、緑膿菌から分離された *rmtA* は他の緑膿菌株に伝達されること、また、セラチア菌の *rmtB* は接合伝達はしないが、プラスミドDNA

により大腸菌が形質転換されることから、いずれもプラスミド性の耐性遺伝子であった。RmtA、RmtB 耐性蛋白は 16S rRNA メチラーゼであった。*rmtA* 遺伝子は水銀耐性遺伝子を保持するトランスポゾン (Tn5041) 内に存在し、*rmtB* は Tn3 の下流に位置存在していた。[荒川]

VanD 型はこれまで世界で数例の報告のみである。日本で臨床分離された *E. raffinosus* VanD VRE の抗菌薬 MIC は、VCM (1,024 µg/ml)、TEIC (256 µg/ml)、GM (2,048 µg/ml)、EM (2,048 µg/ml)、ABPC (32 µg/ml) と、高度多剤耐性であった。D-Ala, D-Lac ligase 遺伝子の PCR 産物の塩基配列から、この株の ligase 遺伝は VanD 型 VRE の VanD1, D2, D3, D4 の中で VanD4 型に相同性が高かった。既に報告されている VanD4 型の ligase 遺伝子の違いは、1,032 塩基中、2 ケ所の塩基が異なっていた。また、タンパクのアミノ酸は 1 ケ所が異なっていた。VanD4 遺伝子は染色体性で、遺伝子発現は恒常的に発現されていた。[池]

1 病院において分離された。19 株の *E. faecalis* VanB 型 VRE の VCM 耐性は、*E. faecalis* 受容菌に液体培地中で高頻度で接合伝達された。代表菌株より得られた接合伝達性プラスミド pUI22 は、117 kbp の *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミドであった。PUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされていた。[池]

呼吸器感染症における原因微生物の網羅的検索を目的として、原因菌となる確率の高い 6 種の微生物に対する PCR 法での同時・迅速診断法の確立をめざした。目的菌は、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③A 群溶血レンサ球菌、④マイコプラズマ菌 (*M.pneumoniae*)、⑤レジオネラ菌 (*L.pneumophila*)、⑥クラミジア菌 (*C.pneumoniae*) である。新たな方法での結果を得るまでの所要時間は、2~2.5 時間に短縮できた。[生方]

メタロ・β-ラクタマーゼ生産菌を迅速検出するために、メタロ・β-ラクタマーゼに特異物に結合する蛍光色素を用いる方法の開発研究を行った。メタロ・β-ラクタマーゼの活性中心に存在する Zn イオンと特異的に結合するチオール基と蛍光色素を含む DansylCnSH (n = 2-6) を化学合成した。この化合物は、メタロ・β-ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的に結合し、タンパク質側鎖と相互作用により蛍光が増大することが解った。[後藤正文]

臨床分離緑膿菌において、これらの排出機構による耐性を検出する方法を開発する目的で、キノロン耐性およびアミノ糖耐性緑膿菌において、排出機構の抗菌薬排出蛋白である *mexB*, *mexY* 遺伝子発現とそれぞれの蛋白を定量した。RT-PCR により mRNA を、ノーザンブロットにより蛋白を定量した結果、相互にほぼ相関関係があった。[後藤直正]

MRSA の各種の AG 不活化酵素遺伝子をコロニーから直接検出する迅速簡便検出法 (Multiple Colony Direct PCR) を開発した。今回この方法の有用性を調べた。臨床分離 MRSA の MIC 検査で、ゲンタマイシン (GM) 耐性およびアルベカシン (ABK) 耐性として分離された菌について、迅速簡便検出法で不活化遺伝子検査した結果、MIC 値の再検査でも耐性菌とされたものはすべて遺伝子も検出できた。[堀田]

第3世代セフェムを分解する菌が AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ多量生産によるものか、ESBL 生産によるものかを鑑別する方法の開発を目的として研究を行った。第3世代セフェムのセフェピムに対する感受性 (または耐性) は AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ生産株と ESBL では異なる。この現象を利用し、寒天平板上での3次元拡散法を用いて、それぞれの生産株を鑑別する方法を開発中である。[山口]

非チフス性サルモネラ菌の多剤耐性機構の研究を行った。染色体性の一群の5剤耐性 (Ampicillin (Ap), Streptomycin (Sm), Sulfonamide (Su), Chloramphenicol (Cm), Tetracycline (Tc) 耐性) を持つ *Salmonella typhimurium* (ST) DT104 の急増が問題となっている。1999年から2000年に千葉県で食中毒患者から分離された ST 37 株の薬剤耐性遺伝子の構造解析を行った。37株中23株 (62%) に、ST の DT104 に存在する5剤耐性を保持していた。[山本]

ニューキノロン低感受性腸チフス菌・パラチフス A 菌の迅速検出方法の研究。ニューキノロン低感受性菌はジャイレース遺伝子の変異によりジャイレースタンパク (*GyrA*) の83番目または87番目のアミノ酸の点突然変異が存在する。これらの変異を PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 法によりスクリーニングする方法を開発した。これは、PCR 法により *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域を増幅し *HinfI* で切断しポリアクリルアミド電気



泳動で切断パターンを比較する方法である。[渡辺]

### 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  
後藤 正文 熊本大学大学院 教授  
後藤 直正 京都薬科大学薬学部 助教  
授  
堀田 国元 国立感染症研究所 室長  
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、およ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、およ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、薬剤耐性菌は国際的にも伝播拡大する。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。我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。過去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。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。また、厚生労働科

学研究の調査研究「薬剤耐性菌の発生動向のネットワークに関する研究」（荒川 宜親班）と連動し、お互い補強し合う形で遂行する。

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ことを目的とする。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・検出法の開発の研究を行う。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い、それらの耐性菌防御の基礎データを得る。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。

## B. 研究方法

1. 薬剤耐性検査、NCCLS 法に基づく寒天平板希釈方法及び微量液体方法を用いた。
2. PCR 法を用いた各種薬剤耐性遺伝子の解析と、新たな薬剤体制遺伝子の検出。
3. 遺伝子塩基配列の決定。

4. 薬剤耐性遺伝子のクローニングと遺伝子構造解析。
5. 遺伝学的変異株の分離と遺伝子発現機構の解析。
6. 免疫化学的方法を用いて、耐性発現蛋白の機能を解析。

## C. 研究結果

### 荒川 宜親：国内で分離されたメタロ-β-ラクタマーゼの遺伝型別

近年、カルバペネム耐性を獲得したセラチアや緑膿菌の臨床分離株の増加が問題となっている。特に、カルバペネム高度耐性を獲得した株としては、メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) と呼ばれる特殊な金属酵素を産生する株が、各地の医療施設から分離され問題となっている。そこで、2001 年 1 月より 2002 年 12 月に国内の医療施設で分離された、広域 β-ラクタム薬耐性株における MBL の産生状況やその遺伝子型別を調べた。調べた菌株は β-ラクタム剤耐性として分離されたグラム陰性菌 978 株である。978 株の中で第 3 世代セフェムのセフトジジムとスルペラゾンに高度耐性の 578 株について解析を行った。メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) による阻害試験 (MBL 簡便検出方法) の結果、587 株中 431 株 (73%) が陽性であった。431 株について、各種 MBL に特異的なプライマーを用いて MBL 型を検査した結果、431 株すべてに

ついて MBL 遺伝子が検出できた。

MBL の産生性を獲得した菌種としては、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)、*Pseudomonas ptida/fluorescens* などが多く、その他、*Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Burkholderia cepacia* などのブドウ糖非発酵菌で MBL 産生菌が多い傾向が見られた。一方、腸内細菌では、*Serratia marcescens*, *Klensiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* などで、MBL 産生株が確認された。MBL の遺伝子型としては、IMP-1 型が最も多かったが、欧州で多く報告されている VIM-2 型 MBL 産生株も各地から分離される傾向が見られた。また、少数ではあるが IMP-2 型 MBL 産生株も確認された。

#### 荒川 宜親：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

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が分離された。ABK 耐性に関与する遺伝子をクローニングし解析を行った。その結果、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判明した (緑膿菌の耐性遺伝子を *rmtA*、

セラチア菌の耐性遺伝子を *rmtB* と名づけた)。また接合実験の結果、緑膿菌から分離された *rmtA* は他の緑膿菌株に伝達されることから、プラスミド上に存在することが示唆された。セラチアから分離された *rmtB* は接合実験で伝達性は確認されないものの、プラスミドを抽出しエレクトロポレーション法で大腸菌に伝達させることが可能であったことから、この遺伝子もプラスミド上にあることが判明した。さらにアイソトープ標識した S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として酵素反応を行い、RmtA および RmtB の 16S rRNA メチラーゼ活性を測定した。その結果、放射活性の取り込みが認められ、RmtA および RmtB は 16S rRNA メチラーゼであることが確認された。

本耐性遺伝子の由来を調べるためそれぞれの酵素遺伝子の周辺の遺伝子構造を調べたところ、*rmtA* とその周辺構造は水銀耐性遺伝子を保持するトランスポゾン (Tn5041) 内に挿入される形で存在した。また *rmtB* は Tn3 の下流に位置することがわかっており、いずれの遺伝子も外来性に病原細菌に取り込まれた可能性が強いことが判明した。

#### 池 康嘉：日本で初めて分離された VanD 型 VRE の解析

バンコマイシン耐性腸球菌

(vancomycin resistant enterococci, VRE) は vancomycin (VCM) および teicoplanin (TEIC) の耐性値、または VCM 耐性遺伝子構造の違いにより、これまで 6 種類が報告されている。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、VanA、VanB、VanD 型で、これらは  $\cdot$ D-Ala<sup>4</sup>, D-Lac<sup>5</sup> ligase 遺伝子をコードし、他の型は  $\cdot$ D-Ala<sup>4</sup>, D-Ser ligase 遺伝子をコードする。VanA、VanB、VanD 型の中で VanA および VanB 型 VRE は一般的に分離されるが、VanD 型はこれまで世界で数例の報告のみである。日本で臨床分離された *E. raffinosus* VanD VRE の抗菌薬 MIC は、VCM (1,024  $\mu$ g/ml)、TEIC (256  $\mu$ g/ml)、GM (2,048  $\mu$ g/ml)、EM (2,048  $\mu$ g/ml)、ABPC (32  $\mu$ g/ml) と、高度多剤耐性であった。ligase 遺伝子の PCR 産物の塩基配列から、この株の ligase 遺伝は VanD 型 VRE の VanD1, D2, D3, D4 の中で VanD4 型に相同性が高かった。既に報告されている VanD4 型の ligase 遺伝子の違いは、1,032 塩基中、2ヶ所の塩基が異なっていた。また、タンパクのアミノ酸は 1ヶ所が異なっていた。VanD4 遺伝子は染色体性で、遺伝子発現は恒常的に発現されていた。

**池 康嘉**：日本初の VRE 院内感染症株

## から分離されたバンコマイシン耐性プラスミドの解析

1999 年 7 月、日本で初めて VanB 型のバンコマイシン耐性腸球菌 (VanB VRE) が 1 病院において分離された。このとき分離された 19 株の *E. faecalis* VanB 型 VRE の Van 遺伝子の接合伝達実験を行った。代表菌株より得られた接合伝達性プラスミド pUI22 は 117 kbp で、PUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされていた。このプラスミドは、*E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミドであった。VanB 遺伝子がフェロモン反応性プラスミド上にコードされ、急速な拡散がおきる可能性が示唆される。

## 井上 松久： $\beta$ -ラクタム系薬高度耐性化に関与する調節遺伝子の同定と診断法の研究

グラム陰性菌の染色体上に一般的に存在する  $\beta$ -lactamase 生産遺伝子 AmpC 遺伝子の変異株を分離し、その調節遺伝子の変異により  $\beta$ -lactamase 生産量が上昇することが解った。

## 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

呼吸器感染症における原因微生物の網羅的検索を目的として、原因菌となる確率の高い 6 種の微生物に対する PCR 法での同時・迅速診断法の確立をめざした。