

平成 15 - 17 年度  
厚生労働科学研究費補助金  
(新興・再興感染症研究事業)

新型の薬剤耐性菌のレファレンス  
並びに耐性機構の解析及び  
迅速・簡便検出法に関する研究  
(H15-新興-9)

総合研究報告書

平成 18 年 4 月

主任研究者 池 康 嘉

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法に関する研究班

班員名簿

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	池 康嘉	群馬大学大学院医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学、同 薬剤耐性菌実験施設	教授
分担研究者 (五十音順)	荒川 宜親	国立感染症研究所 細菌第二部	部長
	井上 松久	北里大学医学部 微生物・寄生虫学	教授
	生方 公子	北里大学 北里生命科学研究所 感染制御免疫部門 感染情報学研究室	教授
	黒崎 博雅	熊本大学大学院 医学薬学研究部 構造機能物理化学分野	助教授
	後藤 直正	京都薬科大学 薬学部 微生物学教室	教授
	山口 恵三	東邦大学 医学部 微生物・感染症学講座	教授
	山本 友子	千葉大学大学院 薬学研究院 微生物薬品化学研究室	教授
	渡辺 治雄	国立感染症研究所 細菌第一部	部長
研究協力者 (順不同)	長沢 光章	防衛医科大学校病院 検査部	
	谷本 弘一	群馬大学 薬剤耐性菌実験施設	
	藤本 修平	群馬大学大学院医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学	
	富田 治芳	同上	
	野村 隆浩	同上	
	井上 貴子	同上	
	和知野 純一	国立感染症研究所 細菌第二部	
	山根 一和	同上	
	鈴木 里和	同上	
	柴田 尚宏	同上	
	木村 幸司	同上	
	甲斐 久美子	同上	
	岡本 了一	北里大学 医学部 微生物・寄生虫学	
	中野 竜一	同上	
	兼子 謙一	同上	
	前山 佳彦	同上	
	石川 直人	同上	
	山口 佳宏	熊本大学大学院医学薬学研究部 構造機能物理化学分野	
	小川 倫洋	京都薬科大学 薬学部 微生物学教室	
	奥野 陽亮	同上	

Alba Jimena	東邦大学 医学部 微生物・感染症学講座
木村総一郎	同上
石井 良和	同上
廣瀬 健二	国立感染症研究所 細菌第一部
和田 昭仁	同上

厚生労働科学研究費補助金 総合・総括研究報告書目次

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

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

# I. 総合研究報告書（平成15年度～平成17年度）

厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症事業)

15年度～17年度 総合報告書

新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法に関する研究

主任研究者 池 康嘉

(群馬大学大学院医学系研究科細菌感染制御学、同 薬剤耐性菌実験施設)

研究要旨

荒川①: アミノグリコシド超高度耐性を付与する 16S rRNA methyltransferase 遺伝子を腸内細菌科やブドウ糖非醗酵群に属するグラム陰性桿菌から発見した。現在まで *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* の 3 種類の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子が同定されている。

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 法によりセフトキシム (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①: 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。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 型であった。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②: 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・荒川: 臨床分離 MRSA1,096 株の抗 MRSA 薬感受性の疫学的調査研究を行い、バンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC)、アルベカシン (ARBK) に対して感受性であった。

井上(岡本): 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。大腸菌のプラスミド pKU601 の場合は、調節遺伝子 *ampR* の点突然変異による。肺炎桿菌のプラスミド pKU631 の場合は、*ampR* 遺伝子が欠失し、*ampC* 遺伝子の上流に挿入遺伝子 *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。臨床分離株の疫学調査により、グラム陰性菌に  $\beta$ -ラクタム剤高度体制を賦与する各種  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL、pAmpC、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ) 生産菌を検出した。

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検出方法としては、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: ClassB メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) の加水分解機構の解明および X 線構造解析を行い、これらの結果に基づき蛍光検出剤および阻害剤開発の開発を行った。メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの活性に必須のアミノ酸 (Asp120) とその活性機構を明らかにした。また、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ検出方法の開発の目的で、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの活性中心の 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 Dansyl CnSH (n=2-6) を化学合成した。

後藤: キノロン薬も含めた抗菌薬多剤耐性に働く緑膿菌のマルチコンポーネント型 RND 排出システムの検出方法の研究を行った。抗体を用いた免疫化学的検出法、定量的 RT-PCR 法および阻害薬との併用による抗菌薬ディスク検出法を考案した。臨床検査レベルでは抗菌薬ディスク検出法がもっとも簡便であることが分かった。緑膿菌の染色体上にコードされたマルチコンポーネント型 RND 排出システムの機能を調べた。このシステムは抗菌薬耐性のみならず、緑膿菌の病原因子発現制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

山口: 3世代セフェム分解酵素の鑑別検出方法の開発、基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ生産腸管出血性大腸炎の発見と解析。新型のカルバペネム分解酵素 KPC-3 (*K. pneumoniae* 生産) の生化学的特性を明らかにした。

山本①: サルモネラの多剤耐性菌の耐性機構と、フルオキノロン高度耐性菌の耐性機構の研究を行った。その結果、サルモネラの多剤耐性には世界的に問題となっているサルモネラ DT104 と同一の耐性遺伝子を持っていることと、トランスポゾン *Tn2610* が DT104 の多剤耐性の起源であることを明らかにした。グラム陰性菌のフルオキノロン高度耐性には、複数の *gyr* (*gyrase*) 遺伝子の変異が存在することを明らかにした。

山本②: 2000 年 4 月～2001 年 3 月分離のグラム陰性桿菌のフルオロキノロン耐性の疫学的調査研究を行った。高度耐性 *Proteus mirabilis* の耐性機構を解析し、高度耐性には、*gryA*, *parC* の変異に



加え *gyrB* 変異が関与していることを明らかにした。PFGE 解析の結果、院内感染が示唆された。

渡邊(広瀬):ニューキノロン低感受性チフス菌、パラチフス A 菌を迅速に検出するため、蛍光プライマーを用いた PCR による検査系を確立した。また、血液からこれらの菌を検出するためのリアルタイム PCR 検査系の開発を行った。MRSA の細胞壁合成における PBP1 の機能を明らかにした。

#### 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 教授  
後藤 直正 京都薬科大学薬学部 助教授  
山口 恵三 東邦大学医学部 教授  
山本 友子 千葉大学大学院薬学研究院 教授  
渡邊 治雄 国立感染症研究所 部長

#### A. 研究目的

薬剤耐性菌による病院内感染症は、日本を含む先進国において共通の深刻で最も多い細菌感染症で、医療の安全を脅かし、高度先進医療の実施と発展に大きな障害となり、医療経済的にもさらなる負担を強いる。この背景には病院の入院患者において、高度先進医療の発展に伴い、より重度の免疫不全状態の易感染患者の増加、及び人口の高齢化による易感染高齢者の増加と、各種抗生物質の多用により、有効な治療薬が存在しないまでに複雑化した、多剤薬剤耐性菌の医療現場への蔓延がある。人々の国際交流の活発化、及び耐性菌に汚染された食肉等の国際的流通の活発化に伴い、薬剤耐性菌の拡散と病院内感染症の制御は、一病棟、一病院、一国家では制御しきれない状

態になっており、国家をあげて取り組むべき問題とされている。薬剤耐性菌制御のための対策は、1) 薬剤耐性菌感染症の調査、2) 薬剤耐性菌の研究、3) 新薬の開発、が不可欠な対策として含まれる。わが国において厚生労働省の事業として薬剤耐性菌感染症の調査に対応するものとして、「薬剤耐性菌感染症サーベイランス事業」が平成 12 年度から開始された。そして「薬剤耐性菌の研究」に対応するものとして本研究課題の研究が平成 12 年度より新規に開始された。平成12年～14年度の3年間の研究において、新たな各種の薬剤耐性菌や、薬剤耐性菌の拡散に関与する新たな接合伝達性プラスミド等も発見されその検出方法の研究と開発を行い、さらに各種の問題となる薬剤耐性菌の現状に関する全国的な調査研究を行い、それ

らの個々の調査結果を厚生労働省に報告してきた。平成15年度からの本研究は、常に変化し発展する医療環境と社会環境に応じて、動的に複雑に変化する多剤薬剤耐性菌制御対策のための研究を、さらに発展させることを目的とするものである。

本研究では、一般の細菌検査室で分離や判定された耐性菌の中から、再試験や、詳しい分析が必要と思われる耐性菌を収集し、最新の検査・解析技術を用いて解析を行う事により、耐性菌の判定の精度を向上させる事が可能となる。また、その結果を検査室に還元することにより、検査室の検査レベルの向上を促すことが期待できる。一方、新たに出現する耐性菌についての分子・遺伝子レベルでの解析を実施することで、それらを検出した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

各分担研究報告書に記載する。

## C. 研究結果

荒川 ①: 国内で分離されたメタロ-β-ラクタマーゼの遺伝型別および4世代セフェムを分解する変異型 AmpC β-ラクタマーゼ

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*, *Klebsiella 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 ②: AmpC 型 β-ラクタマーゼの

CMY-9- $\beta$ -ラクタマーゼのアミ1ヶ所の変異 (I292S) により、4世代セフェムを分解する酵素を肺炎桿菌より分離した

$\beta$ -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: 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、セラチア、および *Proteus mirabilis* 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*、プロテウス菌の耐性遺伝子を *rmtC* 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。疫学研究を行った結果、2,877 株のグラム陰性菌の中に RmtA 株 5 株、RmtB 株 8 株が分離された。

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

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

池②: *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(107kp)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。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* 遺伝子の上流に挿入遺伝子 *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。臨床分離株の疫学調査により、グラム陰性菌に  $\beta$ -ラクタム剤高度体制を賦与する各種  $\beta$ -ラクタマーゼ(ESBL、pAmpC、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ)生産菌を検出した。

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 (IMP-1) の加水分解機構の解明並びに蛍光検出剤・阻害剤開発を目的として研究を行った。第一に、部位特異的変異体実験と変異体の X 線結晶構造解析から、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの活性中心によく保存されている 120 位 Asp は  $\beta$ -ラクタム環のカルボニル炭素を求核攻撃するために、2つのイオン Zn(II)イオンを架橋している  $\text{OH}_2$  または  $\text{OH}^-$  方向付けを行い触媒活性に重要な役割を担っていることが解った。

第二に、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 ( $\text{IC}_{50} = 1.2 \mu\text{M}$ ) 並びに VIM-2 ( $\text{IC}_{50} = 1.1 \mu\text{M}$ ) 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 ( $\text{IC}_{50} = 2.5 \mu\text{M}$ ) 並びに VIM-2 ( $\text{IC}_{50} = 2.4 \mu\text{M}$ ) 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。さらにそれらのメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) 複合体の X 線結晶構造を決定し、立体構造並びに結合方式を分子・原子レベルで明らかにした。

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。*mexAB-oprM* はキノロン *mexXY-oprM* はアミノ配糖代の排出に関与する。*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。これを利用して、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。

後藤 ③: 緑膿菌の Mex 排出システムは抗菌薬耐性のみならず、本菌の Quorum sensing 機構や、病原因子の産生にも関与すること、緑膿菌の 12 種類の Mex システムのすべてが抗菌薬耐性に働くのではなく、それぞれが固有の機能を持ち、緑膿菌の病原性の発揮などに機能していること、Mex 排出システムの機能の阻害によって緑膿菌の病原性の制御が行える可能性を明らかにした。

山口(石井): AmpC 大量産生株における ESBL の検出方法の確立

基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (Extended-spectrum beta-lactamase, ESBL)は、元型の  $\beta$ -ラクタマーゼに安定な第 3 世代セフェム系抗菌薬をも分解する。AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼは元来、第 3 世代セフェムは分解しないが、多量生産株は第 3 セフェムを分解する。第 3 世代セフェムを分解する菌が、AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼの多量生産によるものか、ESBL 生産による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。この現象を利用して、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するための実験を行った。AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ多量生産菌はセフェピムを分解する効率が悪いことから、阻止円が縮小した。一方、ESBL はセフェピムの分解効率がよいことから、阻止円の顕著な縮小が見られた。

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 O157H7 で、次に O26 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 O26 は、ベロ毒素 VT1、生産セフォタキシム(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。

新型のカルバペネム分解酵素 KPC-3 (*K. pneumoniae* の産生)の生化学的解析を行い、その基質特異性・酵素学的特性等を解析した。

山本: 食中毒散発事例より分離された多剤耐性 *Salmonella enterica serova 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 インテグロン 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 SGII 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。

臨床におけるフルオロキノロン耐性の現況を明らかにする目的で、2000 年 4 月～2001 年 3 月分離のグラム陰性桿菌の耐性調査を実施し、日和見感染菌がかなりのスピードで高度耐性化していることを明らかにした。顕著であった高度耐性 *Proteus mirabilis* の耐性機構を解析し、高度耐性には、*gryA*、*parC* の変異に加え *gyrB* 変異が関与していることを明らかにした。PFGE 解析の結果、院内感染が示唆された。

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。肺炎レンサ球菌のペニシリン耐性菌およびその感受性変異菌の PBP<sub>s</sub> の解析を行ったが、両者に差は見られなかった。

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。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 のもつ 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。

池・荒川：2004 年に全国 95 病院より分離され

た MRSA1,096 株の抗 MRSA 薬、バンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC)、アルベカシン (ARBK) に対する疫学調査を行った。VCM は 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ~ 2  $\mu\text{g/ml}$ 、TEIC 0.25  $\mu\text{g/ml}$  ~ 4  $\mu\text{g/ml}$ 、ARBK は 0.13  $\mu\text{g/ml}$  ~ 8  $\mu\text{g/ml}$  であった。

#### 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。荒川等が各種グラム陰性菌で発見されたアルベカシンに超高度耐性 (1,024  $\mu\text{g/ml}$  以上) 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高度耐性であった。これまでにこれらの菌から耐性を賦与する新型の酵素が3種類発見され、緑膿菌、セラチア菌、プロテウス菌から発見されたものが、それぞれ RmtA、RmtB、RmtC と名づけられた。酵素遺伝子 *rmtA*、*rmtB*、*rmtC* はグラム陰性菌の高頻度接合伝達性プラスミド、または接合しない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、RmtC 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】。

Class A および Class B、 $\beta$ -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。荒川等によるボロン酸化合物を用いた新たな Class C  $\beta$ -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  $\beta$ -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 のレファレ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 型のレファレンスの一つとして重要である【池】。



新型のバンコマイシン耐性菌 VanD 型 (VanD4) 型菌を *E. raffinosus* から発見した。この菌は耐性が恒常的に発現し、また染色耐性のペプチドグリカン生産のための ligase が欠損していることが示唆された【池】。

$\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -ラクタマーゼはその生産量が多く、多剤  $\beta$ -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  $\beta$ -ラクタマーゼ生産プラスミドの Class C  $\beta$ -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  $\beta$ -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)】。

また、臨床分離グラム陰性菌の  $\beta$ -ラクタム剤耐性菌の分離頻度の現状を調査した結果は、臨床に役立つ【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- $\beta$ -ラクタマーゼは、すべての  $\beta$ -ラクタム剤を加水分解する。その阻害剤は  $\beta$ -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  $\beta$ -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】。

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの活性領域の分子生物学的 X 線構造解析の研究は、この酵素の物理学的研究成果のもならず、この酵素生産の検出方法、阻害剤開発に有効である【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を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 Mex 排出システムは抗菌薬耐性の

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

米国で分離された ClassA に属する新型のカ

ルバペネム分解酵素 KPC-3 型の解析は、今後日本のこの種の酵素生産菌のレファレンスとなる【山口(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レンス形成のための研究である【山本】。

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

黄色ブドウ球菌、MRSA 等の細胞壁合成酵素 (PBP) の機能解析および肺炎球菌の  $\beta$ -ラクタム剤耐性機構等の解析は充分解っていない。グラム陽性菌に対する  $\beta$ -ラクタム剤の作用機序、およびそれらに対する耐性機構を解析

するための研究として有用である【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】。

## E. 結論

(1) 新型の薬剤耐性機構の発見: 各種グラム陰性菌から発見された新型アミノグリコシド不活化酵素 (RmtA, RmtB, RmtC) はほとんどすべてのアミノグリコシドを不活化し、超高度耐性を賦与する。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、各種菌に拡散し得る【荒川】。緑膿菌の薬剤耐性排出機構によるニューキノロン耐性アミノ配糖体耐性およびカルバペネム感受性となる機構を解明した。緑膿菌の排出機構の新たな細菌生物学的機構の発見【後

藤】。多剤  $\beta$ -ラクタム剤耐性 (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 を発見した。新たなカルバペネム分解酵素 KPC-3 の解析【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】。VanA 型 *E. faecium* より発見された高頻度接合伝達性プラスミドは、新型のまったく新しい薬剤耐性プラスミドである。このプラスミドは、*E. faecium* の薬剤耐性の拡散因子として主要な機能を持つプラスミドである【池】。これらは新型薬剤耐性で、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: ボロン酸化合物を用いたグラム陰性菌のクラス C  $\beta$ -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】。新たに開発したメタロー  $\beta$ -ラクタマーゼの迅速検出方法の有用性を、臨床分離菌を用いて証明した【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、および臨床材料からの両菌の検出方法【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 C  $\beta$ -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。黄色ブドウ球菌のアミノ配糖体不活化酵素の検出方法【堀田】、気道感染症起因菌の検出方法の研究【生方】等である。

(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】。グラム陰性菌臨床分離  $\beta$ -ラクタマーゼ耐性【井上】、臨床分離 MRSA の抗 MRSA 薬感受性【池・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 ampC  $\beta$ -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。臨床分離グラム陰性菌のニューキノロン耐性とその高度耐性機構の研究【山本】。黄色ブドウ球菌の PBP<sub>s</sub> の機能解析【和田】。メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの分子生物学的・生物物理学的機能解析【後藤(正)】。

(5) その他: 不活酵素阻害剤の化学的研究。メタロ- $\beta$ -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】。

## F. 研究成果

荒川 宜親

1. Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Shibata N, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Horizontal transfer of blaCMY-bearing plasmids among clinical

*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(2):534-41 (2006)

2. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, Doi Y, Kimura K, Ike Y, Arakawa Y. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(1):178-84 (2006)

3. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Arakawa Y. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 43(6):2551-8 (2005)

4. Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis.* 11(6):951-3 (2005)

5. Yamaguchi Y, Kuroki T, Yasuzawa H, Higashi T, Jin W, Kawanami A, Yamagata Y, Arakawa Y, Goto M, Kurosaki H. Probing the role of Asp-120(81) of metallo-beta-lactamase (IMP-1) by site-directed mutagenesis, kinetic studies,