

図3 Twin testの判定例

いたTwin testという方法を紹介したい(図2, 図3). cefpodoxime単剤によるスクリーニングで引っかかった株について, その表現型の相違を点数化し, ESBLの genotypeをおおまかにTEM型, SHV型のグループとToho-1, Toho-2, MEN-1型およびRbi-Aなどの*K. oxytoca*由来のclass A β-ラクタマーゼのグループを鑑別する. 約100株の第3世代セフェム薬耐性菌を用いたわれわれの経験では, 一部の例外を除いてこの方法でESBLの型を非常に高い確率で区別することができる. 判定に注意する点としては, 同じβ-ラクタマーゼ産生菌であっても酵素の産生量によって表現型がかなり異なること(SHV-12高度産生菌で判定が食い違う例が存在する),

A) 各 ESB� の型特異的 PCR プライマー

	各 PCR 産物のサイズ
TEM 型 ¹⁰⁾	
T1 5'-CCGTGTCGCCCTTATTCC-3'	
T2 5'-AGGCACCTATCTCAGCGA-3'	824 bp
SHV 型 ¹¹⁾	
S1 5'-ATTTGTGCTTCTTTACTCGC-3'	
S2 5'-TTTATGGCGTTACCTTTGACC-3'	1,051 bp
Toho-1 型 ⁴⁾	
Th1-1 5'-ACGCTACCCCTGCTATTT-3'	
Th1-2 5'-CCTTTCCGCCTTCTGCTC-3'	780 bp
Toho-2 型 ⁵⁾	
Th2-1 5'-GCAGATAATACGCAGGTG-3'	
Th2-2 5'-CGCCGTGGTGGTGTCTCT-3'	354 bp
MEN-1 型 ¹²⁾	
M1 5'-CGGTGCTGAAGAAAAGTG-3'	
M2 5'-TACCCAGCGTCAGATTAC-3'	393 bp
Rbi-A 型などの <i>K. oxytoca</i> 由来の β -ラクタマーゼ ⁷⁾	
R1 5'-GCTGCGACTTATCACTCTCAA-3'	
R2 5'-GCTGCGGCTAACACCTCTTTG-3'	872 bp

B) PCR の方法

滅菌清製水	30 m/	変性	94°C	2分	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; width: 20px; height: 40px; margin-right: 5px;"></div> <div style="text-align: center;"> <p>30 サイクル</p> </div> </div>
10X/バッファー	5 m/	変性	94°C	1分	
dNTP	4 m/	アニーリング	53°C	1分	
プライマー	各 0.5 m/	鎖延長反応	72°C	1.5分	
Taq ポリメラーゼ	0.25 m/	鎖延長反応	72°C	5分	
DNA テンプレート	10 m/				
計	約 50 m/				

*DNA テンプレート

MacFarland 0.5 の濃度の菌液を、100°C、10分、voiling し、4°C、13,000 rpm で5分遠心した上清を用いる。

図4 各 ESB� の型特異的 PCR プライマーと PCR の方法

また ESB� と class C β -ラクタマーゼを同時に産生するような株では、clavulanic acid などの β -ラクタマーゼ阻害剤の効果がマスクされてしまうおそれがある。この Twin test が PCR の実施が困難な場合や、PCR で検索する ESB�s の種類をさらに絞る際に参考になれば幸いである。

われわれが現在臨床的に PCR で検索が必要と考える ESB�s に対する特異的なプライマー (*K. oxytoca* 由来の class A β -ラクタマーゼに対するものも含む) と、PCR の方法を図4に示す。SHV 型に対するプライマーは、われわれはその後に PCR 産物を直接シークエンスしたり、制限酵素で切断することを想定しており、遺伝子の coding 領域の外側にあるプライマーを用いているが、特に偽陰性や偽陽性はみられていない。期待される PCR 産物が得られなかったり、非特異バンドがみられたりする場合は、①耐性因子を落とさないように適切な抗生剤を加えた培地に生えた新鮮な菌株を用いるようにする、②voiling する菌量を変えてみる、③アニーリングの温度

- 1) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth informational supplement M 100-S 9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 1999.
- 2) Ambler RP: The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 289: 321-331, 1980.
- 3) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA: A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211-1233, 1995.
- 4) 黒川博史, 樋渡恒憲, 鈴木和夫ほか: Ceftazidime 耐性 *Klebsiella pneumoniae* および *Escherichia coli* の疫学的な検討. 日本化学療法学会雑誌 44: 1-8, 1996.
- 5) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H *et al.*: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2269-2275, 1995.
- 6) Bernard H, Tancrede C, Livrelli V *et al.*: A novel plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase not derived from TEM-or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother* 29: 590-592, 1992.
- 7) Ma L, Ishii Y, Ishiguro M *et al.*: Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A β -lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1181-1186, 1998.
- 8) Kimura K, Arakawa Y, Ohsuka S *et al.*: Molecular Aspects of high-level resistance to sulbactam-cefoperazone in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1988-1994, 1996.
- 9) Livermore DM: β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8: 557-584, 1995.
- 10) Coudron PE, Moland ES, Sanders CC: Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae at a veterans medical center: seek and you may find. *J Clin Microbiol* 35: 2593-2597, 1997.
- 11) Sutcliffe JG: Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR 322. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3737-3741, 1978.
- 12) Prinarakis EE, Tzelepi E, Gazouli M *et al.*: Characterization of a novel SHV β -lactamase variant that resembles the SHV-5 enzyme. *FEMS Microbiol Lett* 139: 229-234, 1996.
- 13) Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R *et al.*: Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 509-513, 1996.
- 14) Arakawa Y, Ohta M, Kido N *et al.*: Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β -lactamase gene mediated by R plasmids. *FEBS Lett* 207: 69-74, 1986.
- 15) Nuesch-Inderbinen MT, Hachler H, Kayser FH: Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 398-402, 1996.
- 16) Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T *et al.*: Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- β -lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2006-2011, 1998.

アルベカシン耐性 MRSA の判定における問題点と PCR 検定の必要性と有用性

堀田国元*・石川 淳・石井亮一・斎藤文字

国立感染症研究所生物活性物質部

吉良清子・荒川宜親

国立感染症研究所細菌・血液製剤部

池 康嘉

群馬大学医学部微生物学教室

アルベカシン耐性 MRSA の判定における問題点と PCR 検定の必要性と有用性

堀田国元*・石川 淳・石井亮一・斎藤文子

国立感染症研究所生物活性物質部

吉良清子・荒川宜親

国立感染症研究所細菌・血液製剤部

池 康嘉

群馬大学医学部微生物学教室

(1999年6月17日受付)

平成10年に日本各地の病院で臨床分離されたアルベカシン (Arbekacin; ABK) 耐性菌43株を対象に、菌学的性状、アミノグリコシド耐性、およびメチシリン耐性遺伝子 *mecA* と ABK 耐性遺伝子 *aac(6')/aph(2'')* の存否について試験を行った。菌学的性状試験によって33株は黄色ブドウ球菌、10株は腸球菌と同定された。ABK耐性に関しては、0.5%食塩含有普通寒天平板にABKを添加して試験した結果、100 µg/ml以上の高度耐性を示した株は7株 (MRSA 2株、腸球菌5株) で、臨床情報の23株と大きく異なった。2つの耐性遺伝子に関しては、両方一度に検出できる PCR 条件を確立・調査した結果、黄色ブドウ球菌33株はすべて *mecA* 陽性 (すなわち MRSA) で、うち23株が *aac(6')/aph(2'')* 陽性であった。腸球菌はいずれも *mecA* 陰性で、5株が *aac(6')/aph(2'')* 陽性であった。

以上から、日常的臨床検査によりABK耐性MRSAと判定された株は再同定の必要があること、ABK耐性の的確な検定法を確立する必要性があること、ABK耐性MRSAの判定にとって *mecA* と *aac(6')/aph(2'')* の検出が必要で、PCRによる同時検出法は有用であることが認められた。

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) への対処は、共存しながら実害をコントロールしていくという方向が定着しつつあるが、今年4月から施行された感染症新法においてMRSA感染症は第四類感染症と位置付けられ、我が国のサーベイラン

スにおいてMRSAは依然として重要な調査対象菌となっている。MRSA感染症の治療に有効な抗生物質としてはバンコマイシン (Vancomycin; VCM) とともにアルベカシン (Arbekacin; ABK) が1990年代初めから広範に臨床使用されており、これらに耐性のMRSAの出現が懸念されてきた。しかし、

最近の調査においても VCM や ABK に対する MRSA の耐性化は進んでいないことが報告されている²⁾。ABK に関してこれまでに確実にしているのは、低頻度に出現する ABK 中等度耐性の MRSA で、その耐性は二機能修飾酵素 AAC(6')/APH(2'') に依存性である^{3,4)}。しかしながら、ABK 高度耐性 MRSA の報告^{5,6)} や新しい部位を修飾する不活化酵素をもつ ABK 耐性 MRSA の出現を示唆する報告^{4,7)} もみられ、慎重に見守っていく必要がある。

著者らは、ABK 耐性 MRSA に共通して存在する 2 つの遺伝子 *mecA* と *aac(6')/aph(2'')* を同時に検出する PCR 法を確立し、平成 10 年に各地の病院で日常的臨床検査により ABK 耐性 MRSA と判定された 43 株について、菌学的同定、ABK 耐性試験、耐性遺伝子の PCR 検出を行い、これらの間の相関性と臨床情報を評価した。その結果、ABK 耐性に関する臨床情報は必ずしも正確ではなく、ABK 耐性判定に適切な検定法が必要なこと、ABK 耐性 MRSA の判定には PCR 法による上記耐性遺伝子の検出が必要かつ有用と判断されることが明らかになったので報告する。

研究方法

1. 使用菌株

平成 10 年に日本各地の病院において日常的な MRSA 分離・同定検査および感受性検査によりアルベカシン (Arbekacin=ABK) 耐性と判断された 43 株を用いた。菌学的性状試験の結果、33 株が MRSA、10 株が腸球菌と再同定された。

2. 菌学的性状試験

定法に従って、血液寒天、SF 寒天培地および EF 寒天培地上での生育、コロニー形態、グラム染色性、形態観察、およびカタラーゼ試験とコアグラーゼ試験を行った。

3. 耐性試験

アミノグリコシド抗生物質を所定濃度添加した食塩 (0.5%) 含有栄養寒天培地 (栄研) および酵母エキス・麦芽エキス寒天培地 (ISP No. 2; Difco; 食塩非含有) の平板上に菌液 5 μ l (約 10^5 cfu) をマイクロピペットでスポット接種し、37°C 24 および 48 時間培養し、コロニー生育を観察した。

4. PCR

4.1 鋳型 DNA の調製

エッペンドルフチューブに入れた普通ブイヨン (1 ml) に MRSA および未同定株を接種し、37°C 一晚培養し遠沈した菌体を TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-10 mM EDTA (pH 8.0)] 1 ml で洗浄後、500 μ l の TE に懸濁した。これにリゾチーム (1 mg/ml)、リゾスタフィン (10 μ g/ml) を加え、37°C で 30 分インキュベート後、1/10 容の 10% SDS を加えて混和した後、RNase (終濃度 10 μ g/ml) と Proteinase K (終濃度 100 μ g/ml) を加え、50°C でインキュベートした。30 分後、等容のフェノール/クロロホルム (1:1) を加えて激しく混和後、遠心した。その上層 (水層) に 1/10 容の 3 M 酢酸ナトリウムおよび 6/10 容のイソプロパノールを加えて混和し、室温で 10 分間放置後遠沈した。上清を除去し沈澱を 70% エタノールで洗浄、陰圧下で乾燥後、TE に溶解し、PCR 用の鋳型 DNA 液とした。

4.2 プライマー

mecA 遺伝子⁸⁾ と *aac(6')/aph(2'')* 遺伝子⁹⁾ の検出のための独自に設計したプライマーおよび予想される PCR 増幅産物のサイズを図 1 に示した。

4.3 PCR 反応

PCR 反応液 (反応液量 20 μ l) の組成は以下の通りである: DNA サンプル 1 μ l, 各プライマー 0.5 μ M, dNTP 0.2 mM, Taq ポリメラーゼ 1.25 単位。PCR 条件は以下の通りである: 95°C, 3 分 \rightarrow [95°C, 30 秒 \rightarrow 50°C, 30 秒 \rightarrow 72°C, 60 秒] \times 25 回 \rightarrow 72°C, 3 分。PCR 産物は、反応終了後、アガロース電気泳

表2. 隣床分離株のアルベカシン耐性に対する試験培地の影響

	株数	臨床耐性情報 レベル	菌数	普通寒天培地				ISP No. 2寒天培地			
				<5	5	25	100	<5	5	25	100
MRSA	33株	≥128	13	1	5	5	2	5	8	0	0
			64	0	2	0	0	2	0	0	0
			32	0	2	0	0	2	0	0	0
			2~8	13	3	0	0	15	1	0	0
腸球菌	10株	≥128	10	0	0	5	5	2	8	0	0

表3. KM系およびGM系のアミノグリコシド抗生物質に対する臨床分離ABK耐性株の耐性

ABK-耐性株*	Kanamycin				Dibekacin				Amikacin				Gentamicin				Isepamicin				Netilmicin				
	<5	5	25	100	<5	5	25	100	<5	5	25	100	<5	5	25	100	<5	5	25	100	<5	5	25	100	
[MRSA]																									
<5:	14	0	2	1	11	2	6	3	3	0	6	8	0	5	5	2	2	0	6	8	0	7	5	2	0
5:	11	0	0	0	11	0	0	1	10	0	0	5	6	1	1	9	0	0	0	6	5	1	0	2	8
25:	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	2	4	0	1	0	5	0	0	1	5	0	0	1	5
100:	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	2
[腸球菌]																									
25:	5	0	0	1	4	0	2	1	4	0	0	2	3	0	2	1	2	0	0	1	4	0	1	1	3
100:	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5

* ABK耐性度 (μ g/ml)によりグループ分けした菌株のKM系およびGM系の各抗生物質に対する耐性分布を示した。

2. アミノグリコシド耐性

表2に食塩含有普通寒天培地 (NA) および非含有培地 (No. 2) において行ったABK耐性試験の結果を臨床情報と並べて示した。黄色ブドウ球菌では臨床情報と今回の試験結果の間に相関性が認められなかった。すなわち、臨床情報では13株が高度(128 μ g/ml以上)ABK耐性とされていたが、NA培地での試験では2株(100 μ g/ml耐性)しか認められず、No. 2培地ではすべての株が25 μ g/ml以

下のABK耐性しか示さなかった。一方、腸球菌については臨床情報ではすべて高度耐性であったが、NA培地において100 μ g/mlの耐性が確認されたのは5株であった。

表3は、NA培地で判定したABK耐性レベルに従ってABK耐性菌をグループ分けし、それらが他のアミノグリコシド抗生物質に対する耐性がどのようなグループ分けになるかを行ったものである。その結果、例えば、ABKに5 μ g/ml耐性を示

した11株のMRSAは、GentamicinとNetilmicinに対する1,2の例外を除いてすべての試験したアミノグリコシド抗生物質に25~ >100 µg/mlの耐性を示した。このことに見られるように、アミノグリコシド耐性に関してほとんどすべての菌株はABKに対する耐性がもっとも低いということが認められた。

3. PCRによる耐性遺伝子*mecA*と*aac(6')/aph(2'')*の検出

aac(6')/aph(2'') 遺伝子をもつことをすでに明らかにしてあった*S. aureus* AR19株(MRSA)のDNAを鋳型として、*mecA* および *aac(6')/aph(2'')* のPCR検出を検討した。その結果を図2に示したが、各遺伝子のプライマーの組み合わせで(図2の①~④)は設計通りいずれも明瞭な増幅バンドが検出された。一方、両遺伝子のプライマーを組み合わせた場合(図2の⑤~⑦)、いずれも予定通り2本の増幅バンドが認められたが、2本とも明瞭であったのは⑤の組み合わせであった。

そこで、⑤の組み合わせ、すなわち *mec1*, *mec2*, P1 および P2c の4種のプライマーを加えたPCR反応条件でABK耐性菌43株から調製したDNAを鋳型としてPCR反応を行った。その結果、図3に示した例のように、両遺伝子が検出されるもの、

mecA だけが検出されるもの、*aac(6')/aph(2'')* だけが検出されるもの、両方検出されないものという4つのケースが認められた。*mecA* が認められたのはすべて菌学試験で黄色ブドウ球菌と同一とされた33株と完全に一致したのでそれら33株はMRSAと判定された。

表4には各菌株のPCR結果をABK耐性試験の結果とともに要約して示した。MRSA33株においてはいずれの株でも*mecA* 遺伝子が検出されたが、

図2. *mecA* および *aac(6')/aph(2'')* のPCR増幅に対するプライマーの組み合わせの影響

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
<i>mec1</i>		P1	P2	P1	<i>mec1</i>	<i>mec1</i>	<i>mec1</i>
<i>mec2</i>		P2c	P3	P3	<i>mec2</i>	<i>mec2</i>	<i>mec2</i>
					P1	P2	P1
					P2c	P3	P3

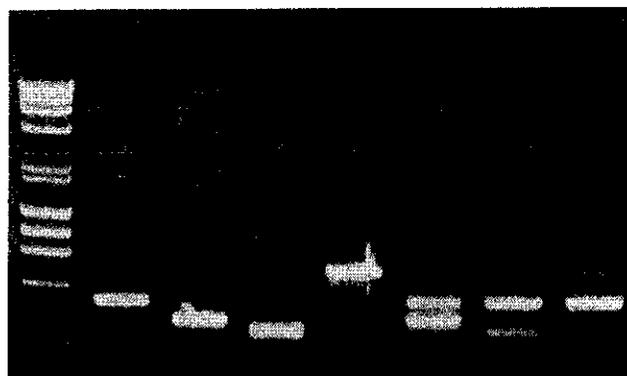


図3. 臨床分離アルベカシン耐性株の *mecA* および *aac(6')/aph(2'')* のPCR検出



<i>mecA</i> :	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>aac-aph</i> :	-	-	+	+	-	+	+	+

表4. ABK 耐性臨床分離株の耐性遺伝子と ABK 耐性レベル

供試菌株	<i>mecA</i>	<i>aac(6')/aph(2'')</i>	株数	ABK 耐性度*	同定菌種
MRSA(33 株)	+	+	21	≤ 25	<i>S. aureus</i>
			2	100	<i>S. aureus</i>
	+	-	10	< 5	<i>S. aureus</i>
腸球菌(10 株)	-	+	5	25 ~ >100	<i>E. faecalis</i>
	-	-	4	25 ~ >100	<i>E. faecalis</i>
			1	>100	<i>E. faecium</i>

* ABK含有普通寒天培地(食塩0.5%)における耐性度(μ l/ml)

aac(6')/aph(2'') は23株しか認められず, 残りの10株では検出されなかった。この10株では2株が0.5% NaCl含有普通寒天培地において5 μ g/mlのABK耐性を示したが, 他の8株はABK感受性と判断された。以上のことから, *aac(6')/aph(2'')* 遺伝子の存否とABK耐性レベルの間に明瞭な相関が認められた。

一方, 腸球菌10株ではいずれも*mecA*が検出されず, 5株において*aac(6')/aph(2'')*が検出された。ABK高度耐性株は5株認められた(表3)が, *aac(6')/aph(2'')*の存否との相関性は認められなかった(表4)。

考察

日常的なMRSAの分離・同定と薬剤感受性試験によりABK耐性と判定された43株は, 菌学的再同定試験により33株が黄色ブドウ球菌と同定され, すべての菌株から*mecA*遺伝子が検出されたことからMRSAと確認された。残り10株は腸球菌と同定され, *mecA*遺伝子は検出されなかった。これらのことは, 現在日常的に行われているMRSA検査法では, 腸球菌をMRSAと判定してしまう危険性があることを示しており, MRSAの分離・同定の精度の向上が必要なことを示唆している。

ABK耐性に関しても, 43株中の23株(MRSA13

株, 腸球菌10株)が高度耐性(100 μ g/ml)という臨床情報を確認できたのは7株(MRSA2株, 腸球菌5株)に過ぎなかった。臨床では菌を塗布した寒天培地上にABK含有ペーパーディスクにおいて耐性を判定していると思われるが, われわれはABKを添加した0.5%食塩含有普通寒天培地に菌を10⁶cfu接種して耐性を調べた。この方法ではクリアカットな結果が得られ, 判定が容易である。一方, アミノグリコシド抗生物質の活性は試験培地中のカチオンによって影響を受け, その濃度が高いほど見かけ上の耐性レベルは高くなることが知られている¹⁰⁾。われわれが行った43株の試験においても, 0.5% NaCl含有普通寒天培地と非NaCl含有寒天培地(ISP No. 2: 麦芽エキス・酵母エキス培地)での耐性試験結果に大きな差が認められ, 前者で認められたABK高度耐性も後者では5 μ g/mlの耐性しか示さなかった。また, ABKは腸球菌に対する活性が弱いので腸球菌のABK耐性は元々高いが, それでもカチオン濃度の低い培地では比較的低い耐性しか示さない。以上のことから, ABK耐性レベルを的確に試験できる方法を確立し, 臨床に導入することが必要と思われる。

遺伝子に関しては, これまでの報告からABK耐性MRSAに共通して存在することが予想された*mecA*と*aac(6')/aph(2'')*をPCRでチェックした結果, 菌学試験でブドウ球菌と判定された33菌株す

べてから *mecA* が検出され、MRSAと判定された。そのうち23株からは *aac(6')/aph(2'')* が検出されたが、残りの10株からは検出されず、いずれもABK感受性であった。以上のことから、MRSAのABK耐性と *aac(6')/aph(2'')* の間には相関性があると判断された。

最近の報告^{4,11-13)}によると、アミノグリコシド耐性MRSAやGentamicin (GM)に高度耐性の腸球菌 (*E. faecalis*)において *aac(6')/aph(2'')* がもっとも頻度高く検出されており、また、この酵素は驚くほど広い基質特異性をもっていること¹⁴⁾からABK耐性に関して要注意と判断される。特に、高度GM耐性を示すMRSAはABKに対しても高い耐性を示す可能性がありもっとも注意を要すると思われる⁶⁾。

総合的にみて、本研究や他の報告¹¹⁾のように *mecA* と *aac(6')/aph(2'')* の両遺伝子を一度のPCRで検出する方法は、腸球菌とMRSAを識別できることからABK耐性MRSAの検出と判定にとって必要性和有効性の高い方法と判断される。

一方、*aac(6')/aph(2'')* が検出されなかった10株のMRSA中に5 µg/mlのABK耐性を示した菌株が2株認められたが、今後その耐性因子の解明が必要と思われる。

参考文献

- 1) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律。平成11年4月1日施行
- 2) 高橋孝行, 松本文夫, 宮崎修一: 1997年度分離メチシリン耐性ブドウ球菌に対する arbekacin, vancomycin および teicoplanin の *in vitro* 抗菌力の比較。日化療誌 47: 103~107, 1999
- 3) KONDO, S.; Structures of enzymatically modified products of arbekacin by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antibiotics 46: 310~315, 1993
- 4) 藤村 茂, 貫和敏博, 久道周彦, 渡辺 彰: 本邦における arbekacin (ABK) 耐性 *Staphylococcus aureus* の ABK 修飾酵素の分布状況。化学療法の領域 14: 100~104, 1998
- 5) 鈴木隆男: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* における arbekacin の高度耐性化について。Jpn. J. Chemother. 44: 129~135, 1996
- 6) 出口浩一, 鈴木由美子, 石原理加, 石井由紀子, 中澤ありさ, 松本好弘, 西成千里, 中根 豊: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する arbekacin の経年的抗菌活性。Jpn. J. Antibiotics 50: 1~11, 1997
- 7) 藤村 茂, 徳江 豊, 高橋 洋, 貫和敏博, 渡辺 彰: Arbekacin 耐性 MRSA からの aminoglycosid 修飾酵素による arbekacin の不活化。日化療誌 47: 1~7, 1998
- 8) SONG, M. D.; M. WACHI, M. DOI, F. ISHINO & M. MATSUHASHI: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett. 221: 167~171, 1987
- 9) ROUCH, D. A.; M. E. BYRNE, Y. C. KONG & R. A. SKURRAY: The *aacA-aphC* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: Expression and nucleotide sequence analysis. J. Gen. Microbiol. 133: 3039~3052, 1987
- 10) HOTTA, K. & Y. OKAMI: Effect of Mg⁺⁺ on binding of aminoglycoside antibiotics to their producers. J. Ferment. Technol. 54: 563~571, 1976
- 11) VANHOOF, R.; C. GODARD, J. CONTENT & H.J. NYSSSEN, E.: Hannecartpokorni & the Belgian Study Group of Hospital Infections: Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. J. Med. Microbiol. 41: 282~290, 1994
- 12) CASETTA, A.; A. B. HOI, G. DECESPEDES & T. HORAUD: Diversity of structures carrying the high-level gentamicin resistance gene (*aac6-aph2*) in *Enterococcus faecalis* strains isolated in France. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2889~2892, 1998
- 13) CULEBRAS, E. & J. L. MARTINEZ: Aminoglycoside resistance mediated by the bifunctional enzyme 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase-2''-O-aminoglycoside phosphotransferase. Frontiers in Bioscience 4: 1~8, 1999.
- 14) DAIGLE, D. M.; D. W. HUGHES & G. D. WRIGHT: Prodigious substrate specificity of AAC(6')-APH(2''), an aminoglycoside antibiotic resistance determinant in enterococci and staphylococci. Chemistry & Biology 6: 99~110, 1999

NECESSITY AND USEFULNESS OF DETECTION BY PCR OF *mecA* AND *aac(6')/aph(2'')* GENES FOR IDENTIFICATION OF ARBEKACIN-RESISTANT MRSA

KUNIMOTO HOTTA*, JUN ISHIKAWA, RYOICHI ISHII and FUMIKO SAITOH
Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases

KIYOKO KIRA and YOSHICHIKA ARAKAWA
Department of Bacterial and Blood Products, National Institute of Infectious Diseases

YASUYOSHI IKE
School of Medicine, Gunma University

Arbekacin (ABK)-resistant bacteria (43 strains) isolated as MRSA by regular clinical procedures in Japanese clinics in 1998 were characterized in terms of taxonomic properties, aminoglycoside resistance, and *mecA* and *aac(6')/aph(2'')* genes linking with ABK-resistant MRSA. Taxonomically the 43 strains fell into *Staphylococcus aureus* (33 strains) and *Enterococcus* (10 strains). As to ABK resistance, the 13 strains of MRSA clinically reported as high ABK resistants (128 µg/ml or higher) did not show clear high ABK resistance except for 2 strains when their ABK resistance was tested using 0.5% NaCl containing nutrient agar. We designed and established the primers and conditions for PCR to detect the above two resistance genes. PCR analysis of DNAs from the 43 strains clearly indicated that only 33 strains identified taxonomically as *S. aureus* possessed *mecA* indicating MRSA and 23 out of them possessed *aac(6')/aph(2'')*. The other 10 strains of MRSA lacking *aac(6')/aph(2'')* were ABK-sensitive. Thus, there were a good correlation between ABK resistance and *aac(6')/aph(2'')* existence.

Based on these, it was conclusive that the appropriate ABK resistance test as well as the detection of *mecA* and *aac(6')/aph(2'')* genes by PCR are necessary and useful to avoid false ABK-resistant MRSA strains.

β-ラクタマーゼの機能分類と分子分類

荒川 宜親

国立感染症研究所細菌・血液製剤部
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4丁目7-1

〔受理：1999年5月10日〕

はじめに

1940年代半ばに工業的なペニシリンの大量生産が開始され半世紀が経過した。この間に各種の半合成ペニシリンや半合成セファロスポリン、セファマイシン、モノバクタム、カルバペネムなど多様なβ-ラクタム薬の開発が意欲的に押し進められ、臨床、特に入院患者に投与される抗菌薬の大半をこれらのβ-ラクタム薬が占めるなど、β-ラクタム薬は、臨床上最も重要な抗菌薬となっている。

しかし、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)、一方では、第三世代セフェム薬に耐性を獲得した肺炎桿菌 (ESBL 産生菌) (50)、カルバペネム耐性緑膿菌 (IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌) (18, 47)、さらに、ペニシリン耐性インフルエンザ菌など、種々のβ-ラクタム薬耐性菌の出現とそれらによる感染症の広がりが、欧米やわが国で大きな問題となっている (35)。

この様な状況下において、患者から臨床分離細菌が如何なるメカニズムによりβ-ラクタム薬に耐性を獲得しているのか、さらに、どのような種類のβ-ラクタマーゼを産生しているかを念頭に置いて、適正な抗菌薬療法を実施する事が求めら

る時代が来ようとしている。

本稿では、臨床家が化学療法を実施する上で最小限知っておく必要があると思われる、主なβ-ラクタマーゼの特徴と分類について概説する。

1. β-ラクタム薬耐性の分子機構

細菌が、β-ラクタム薬に耐性を獲得する機構には、細菌の膜におけるβ-ラクタム薬の透過の減少やβ-ラクタム薬の標的であるペニシリン結合蛋白 (PBP: ペプチドグリカン合成酵素) の変異などがあるが、最も主要な耐性獲得機構としてβ-ラクタム薬を分解するβ-ラクタマーゼの産生があげられる。

細菌が産生するβ-ラクタマーゼは、古くからペニシリナーゼ (1) やセファロスポリナーゼ (45) などと呼ばれて来た。例えば肺炎桿菌や緑膿菌などは、各々、染色体上に各々ペニシリナーゼ (LEN-1) (3)、あるいはセファロスポリナーゼ (AmpC) (36) などのβ-ラクタマーゼの産生に関与する遺伝子をほぼ例外無く持っており、生来ペニシリンに耐性を示す事は良く知られている。一方、R-プラスミド (以前はエピゾームなどとも呼ばれた) によって媒介されているβ-ラクタマーゼ、例えば代表的なプラスミド依存性のペニシリナーゼである TEM-1 (17) やオキサリナーゼである OXA-1 (49) の遺伝子は、接合により菌種を超えて伝達され、多くのグラム陰性菌に広がっている。表1に主な病原細菌の産生するβ-ラクタマーゼを示す。

Yoshichika ARAKAWA
Functional and Molecular Classification of β-lactamases
Department of Bacterial and Blood Products, National
Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011

表1. 主な病原細菌の産生するβ-ラクタマーゼ

グラム陽性菌	染色体性	プラスミド性
黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)		ペニシリナーゼ
腸球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)		ペニシリナーゼ
グラム陰性菌	染色体性	プラスミド性
緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	AmpC	OXA-, PSE-, TEM-, IMP-1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	L1	
肺炎桿菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	ペニシリナーゼ	SHV-, TEM-由来ESBL, MOX-1
大腸菌 (<i>E. coli</i>)	(AmpC)	SHV-, TEM-由来ESBL, Toho-1
<i>Serratia, Enterobacter, Citrobacter</i> などの腸内細菌科	AmpC	SHV-, TEM-由来ESBL
<i>Klebsiella oxytoca</i>	K1, KOXY, RbiA	SHV-, TEM-由来ESBL (SHV-5 など)
インフルエンザ桿菌 (<i>Haemophilus influenzae</i>)		ペニシリナーゼ
<i>Moraxella catarrhalis</i>	ペニシリナーゼ	
淋菌 (<i>Neisseria gonorrhoea</i>)		ペニシリナーゼ
<i>Bacteroides fragilis</i>	CfiA, CcrA	CfiA (一部)

2. β-ラクタマーゼの分子構造による分類

細菌が産生するβ-ラクタマーゼは、β-ラクタム薬のβ-ラクタム環に含まれるペプチド結合様のC-N結合を加水分解する広義の「ペプチダーゼ」と考えられる。ペプチダーゼの一種である、プロテアーゼがセリン-プロテアーゼとメタロ-プロテアーゼに大別されるように、β-ラクタマーゼもその構造的特徴からセリン-β-ラクタマーゼとメタロ-β-ラクタマーゼに大別される(図1)。二者は、分子構造が大きく異なり、全く別の分子ファミリーに属する酵素である(図2)。

セリン型β-ラクタマーゼは、酵素の活性中心にセリン残基を持ち、基質であるβ-ラクタム薬を分解する過程で基質とアシル中間体を一旦生成した後、β-ラクタム環の加水分解が起こる(51)。これに対し、メタロ-β-ラクタマーゼは、酵素の活性中心に亜鉛を保有しており、この亜鉛に結合した不安定状態の水分子が、β-ラクタム環を攻撃し加水分解する(34)。このように、セリン-β-ラクタマーゼとメタロ-β-ラクタマーゼは、全く異なるメカニズムにより、β-ラクタム薬を加水分解する。

Amblerは、1980年に、β-ラクタマーゼのアミ

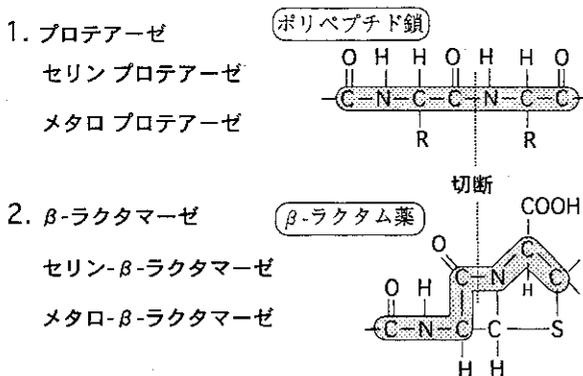


図1. C-N結合を加水分解する酵素の2大グループ

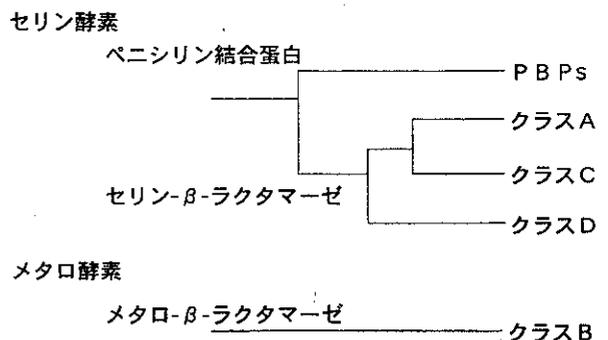


図2. ペニシリンに結合又は分解する2大分子ファミリー

ノ酸配列の相違に着目した分類法を提唱した(2)。この分類法を発展させ、現在、セリン-β-ラクタマーゼは、クラス A, C, D の3つのサブクラスに分けられ、メタロ-β-ラクタマーゼは、クラス B に分類され、Ambler の分子分類法として、現在でも広く用いられている。表2に Ambler の分子分類法と Bush らの機能分類を対比して示す。

3. セリン-β-ラクタマーゼの由来

肺炎桿菌は、染色体上にグループ2に分類されるペニシリナーゼの産生にかかわる遺伝子を持ち(3)、一方、*Enterobacter* (25) や *Citrobacter* (29), *Serratia* (26) などの腸内細菌科や緑膿菌(28)などは、染色体上にグループ1に分類されるセファロスポリナーゼ(AmpC)の産生にかかわる遺伝子を持っているが、それらを破壊しても、通常の培養環境下では、菌は正常に分裂・増殖する事が可能である。セリン型β-ラクタマーゼの遺伝子の構造を詳しく解析すると、ペニシリンなどのβ-ラクタム薬の標的であり、ペプチドグリカンの生合成に関与するペニシリン結合蛋白(PBPs)のC-末端側の半分と構造が類似している(16)(図3)。PBPsのこの領域は、トランスペプチダーゼ活性を有しており、ペプチドグリカ

ンの架橋反応の際に、ペプチド鎖のC-N結合を一旦切り離す機能を有するとされている。したがって、セリン-β-ラクタマーゼは、低分子量のPBP、例えば、PBP5(D,D-カルボキシペプチダーゼ)(15)に由来したり、あるいは、高分子のPBPsのN-末端側が脱落してできた酵素とも考えられるが、その本来の機能や由来は不明である。

4. セリン型β-ラクタマーゼの機能分類と分子分類の関連

1995年に Bush らにより提唱された機能分類によると、セリン型β-ラクタマーゼは、グループ1、グループ2の2種に大別される(11)(表2)。

グループ1に属するβ-ラクタマーゼの代表は、緑膿菌や *Enterobacter* 属、*Citrobacter* 属などの腸内細菌科のグラム陰性桿菌が染色体性に産生する AmpC 型β-ラクタマーゼ(セファロスポリナーゼ)である。Ambler の分子分類では、クラスCに相当する。図4にグループ1に属するβ-ラクタマーゼ(AmpC)の遺伝的な系統樹を示す。このグループのβ-ラクタマーゼの産生は、AmpR などの調節蛋白により調節されており(19)、誘導型の産生調節を受けているが、最近、脱抑制的・構成的(constitutive)に、多量の

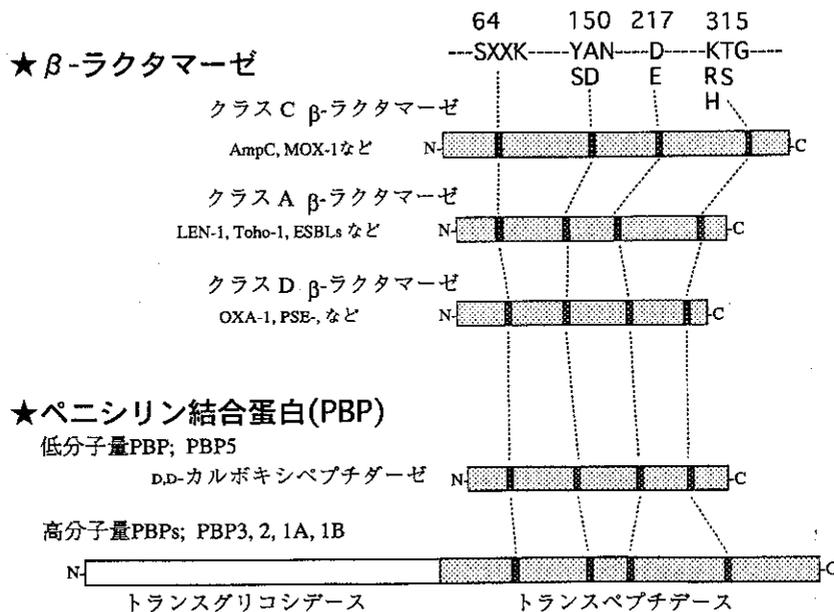


図3. ペニシリンと反応する酵素ファミリーの基本構造

表 2.

Ambler による分子分類	Bush らによる機能分類	β -ラクタマーゼの名称	β -ラクタマーゼの特徴	産生する菌種名	遺伝子の所在 P-plasmid C-染色体
クラス A	グループ 2a	LEN-1, PC1	ペニシリナーゼ	<i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>	C or P
	グループ 2b	TEM-1, TEM-2 SHV-1	ペニシリナーゼ ペニシリナーゼ	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> などのグラム陰性桿菌	P
	グループ 2be	TEM-3 以降 SHV-2 以降 Toho-1, RbiA	CAZ, CTX などの 第三世代セフェム薬を分解	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> などのグラム陰性桿菌全般	P
	グループ 2br	TEM-30~ TEM-41	阻害剤抵抗性	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> などのグラム陰性桿菌全般	P
	グループ 2c	PSE-1, PSE-3 PSE-4 など	ペニシリナーゼ カルペニシリナーゼ	主に <i>P. aeruginosa</i> , 一部 <i>Acinetobacter</i> など	P
	グループ 2e	セファロスポリナーゼ	誘導型セファロスポリナーゼ	<i>P. vulgaris</i> , <i>Y. enterocolitica</i>	C
	グループ 2f	NMC-A, Sme-1	カルバペネムも分解	<i>E. cloacae</i> , <i>S. marcescens</i>	P
クラス B	グループ 3	CphA, CfiA, L1	カルバペネムを分解	<i>B. fragilis</i> , <i>A. hydrophila</i> <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	C
		CcrA, IMP-1	カルバペネムを分解	<i>B. fragilis</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	C or P
クラス C	グループ 1	AmpC	セファロスポリナーゼ	<i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	C
		MOX-1, FOX-1 MIR-1 など	セファロスポリナーゼ セファマイシンを分解するものもある	<i>K. pneumoniae</i> などのグラム陰性桿菌	P
クラス D	グループ 2d	OXA-1~ OXA-16	オキサリナーゼ OXA-2, 10, 11 OXA-14-16 などは ESBL に加える	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> 等のグラム陰性桿菌	P

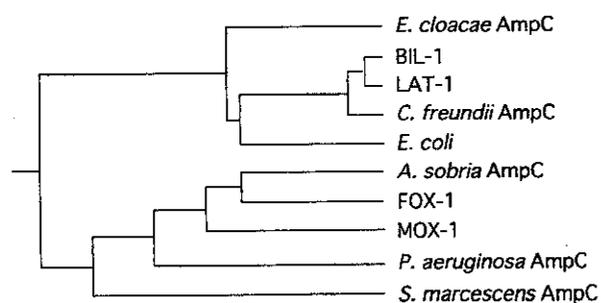


図 4: グループ 1 (クラス C) に属する主な β -ラクタマーゼの関係

AmpC 型 β -ラクタマーゼを産生しセフェム薬に高度耐性を示す *Enterobacter cloacae* (9) や *Citrobacter freundii* (14), さらに, プラスミド依存性にこの種の β -ラクタマーゼを過剰産生する *K. pneumoniae* (10, 20) などが, 国内外で多数報告されるようになった。さらに, アミノ酸配列の一部が変異することにより, セファマイシンなどを効率良く分解する能力を獲得した基質拡張型 AmpC 型 β -ラクタマーゼも *K. pneumoniae* などで報告されている (7, 20, 37)。

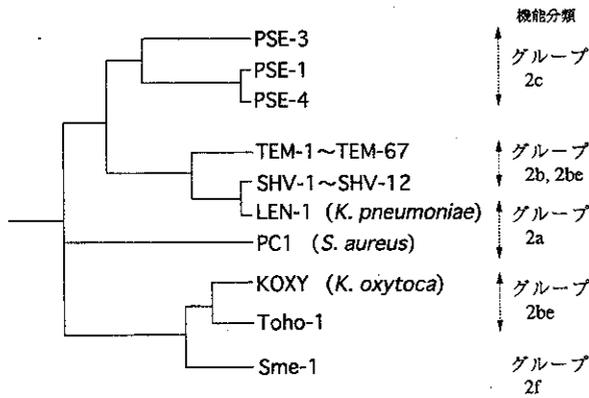


図5. グループ2 (クラス A) に属する主な β -ラクタマーゼの関係

一方、グループ2の代表は、肺炎桿菌が染色体体依存性に産生するペニシリナーゼ (3, 32) や種々の R-プラスミドに依存性して産生される、TEM-型や SHV-型のペニシリナーゼ (6, 13) であり、Ambler の分子分類ではクラス A に相当する。図5にグループ2に属する β -ラクタマーゼの遺伝的な系統樹を示す。特に、1980年代の半ばより、欧州で TEM-型や SHV-型のペニシリナーゼのアミノ酸配列の一部が変異し、セフトラジウムやセフトキシムなど第三世代セフェム薬を分解する能力を獲得した β -ラクタマーゼが出現し、それらは、ESBL (Extended-spectrum β -lactamase) と総称され、現在、欧米の医療機関

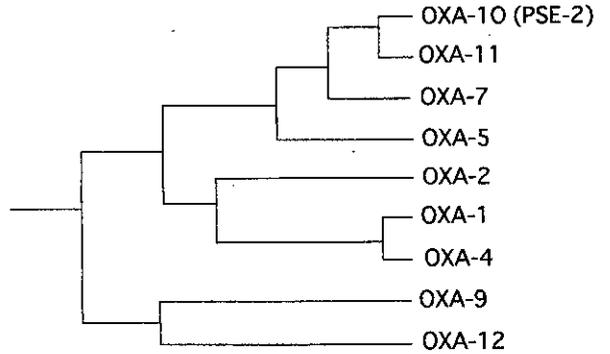


図7. グループ 2d (クラス D) に属する主な β -ラクタマーゼの関係

で大きな問題となっている (54, 56)。ESBL は Bush の分類では、グループ 2be に分類され、現時点で TEM-由来又は、SHV-由来 ESBL として、各々60数種類 (12) と10数種類が登録されている。また、TEM-の番号が30番台などの酵素は、クラブラン酸によって阻害されにくいという特徴を示し、Bush らによりグループ 2br に分類されている。図6に ESBL に含まれる β -ラクタマーゼの遺伝的な系統樹の概要を示す。

また、最近、グループ 2d (クラス D) に分類される OXA-由来の β -ラクタマーゼの一部も ESBL に加える事が Jacoby らにより提唱されている (24) (図7)。

一方、我が国では、TEM-, SHV 由来の

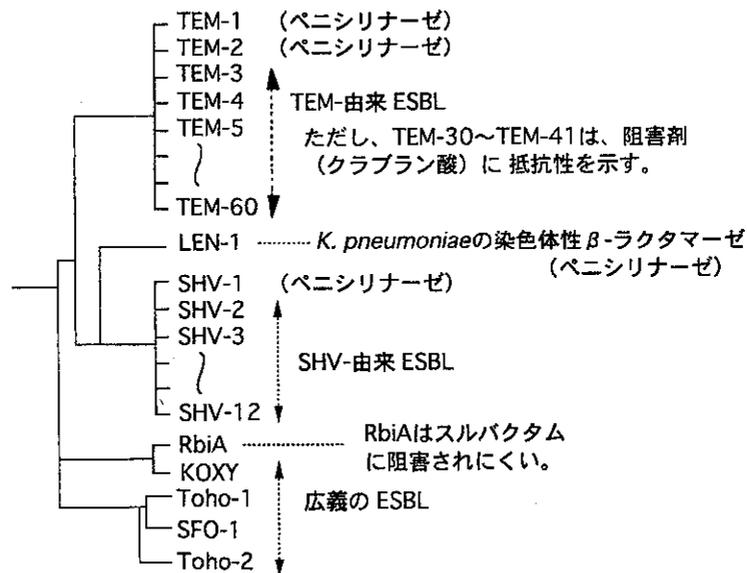


図6. グループ 2b, 2be (クラス A) に属する ESBLs の遺伝学的相互関連

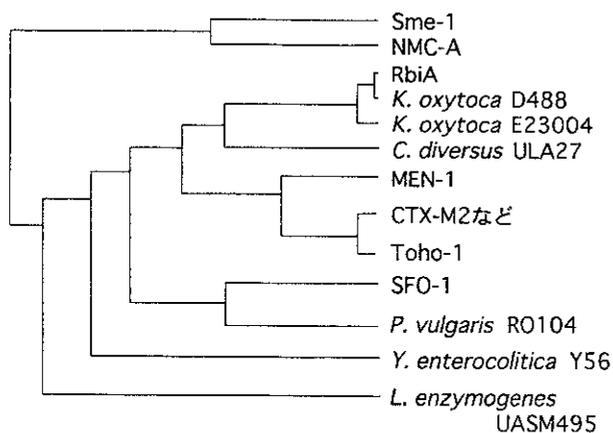


図8. グループ2 (クラス A) に属する主な β -ラクタマーゼの関係

ESBL は少なく、そのかわり、Toho-型の β -ラクタマーゼを産生する CTX 耐性の大腸菌などが各地から分離されている (22, 30, 33, 55)。また、*Klebsiella oxytoca* は、以前よりセファロスポリンに耐性を示すものが多いことが知られていたが、セフォペラゾン耐性を示す臨床分離株の染色体性の β -ラクタマーゼの遺伝子の構造が明かにされた結果 (33)、それは、セファロスポリナーゼである AmpC とは大きく異なり、むしろクラス A の β -ラクタマーゼのグループに属し、*Proteus vulgaris* などが染色体依存性に産生する β -ラクタマーゼ (41) や、Toho-1 と近縁の関係あることが判明した (4)。さらに、このグループの β -ラクタマーゼには、RbiA のようにスルパクタムによって阻害されにくいものも報告されている (27)。

図8に TEM-由来又は SHV-由来 ESBL の以外のグループ2に属する β -ラクタマーゼの全体的な遺伝的系統関係を示す。

5. メタロ- β -ラクタマーゼの基質特異性と遺伝学的相互関連

酵素の活性中心に亜鉛を持つ、メタロ- β -ラクタマーゼは、古くから *Bacillus* 属 (44) やブドウ糖非発酵菌である *Stenotrophomonas maltophilia* (旧名 *Pseudomonas maltophilia*, *Xanthomonas maltophilia*) (46) などで報告されていた。その他、*Bacteroides fragilis* (5)、*Aeromonas hydrophila* など (8, 21, 38, 43, 52) にもメタ

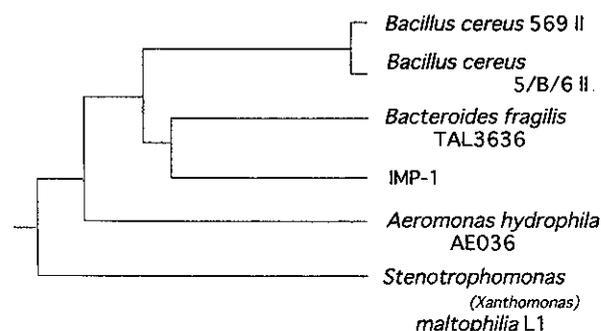


図9. グループ3 (クラス B) に属する主な β -ラクタマーゼの関係

ロ- β -ラクタマーゼを産生するものが報告されている。メタロ- β -ラクタマーゼは、活性中心の亜鉛に結合した不安定な水分子により、 β -ラクタム環が加水分解される (53) ため、側鎖構造の異なる各種の β -ラクタムを幅広く分解する事ができる (40)。しかし、その中でピペラシリンやアズトレオナムは、酵素の活性中心との親和性が低いとされ、 β -ラクタム薬の中では、比較的分解され難い傾向が見られる (39)。Rasmussen らは、イミペネムの分解活性を基準とした場合、ペニシリンやセファロスポリンの分解活性が60%以上のグループをサブグループ 3a、60%以下のグループをサブグループ 3b とすることを提案している (42)。

表2にこれまで報告されている主なメタロ- β -ラクタマーゼを示す。また、それらの分子遺伝学的な系統樹を図9に示す。

メタロ- β -ラクタマーゼのアミノ酸配列を比較した場合、IMP-1 や *B. fragilis* などの産生する酵素は、お互いに近縁の関係にあるが、それらを *A. hydrophila* が産生するメタロ- β -ラクタマーゼである CphA と比較した場合、16個のアミノ酸残基の挿入が見られるなど、かなりの多様性が見られる (31)。(図10) とりわけ、我が国では、プラスミドに依存して IMP-1 型メタロ- β -ラクタマーゼを産生する緑膿菌 (18) や *S. marcescens* (23) などのグラム陰性菌が各地から多数分離 (48) されており、今後の広がりを警戒する必要がある。

BacII	MKNILLKLGVCVSLGITPFVSTISSVQAERTVEHKVTKNETGTTISISQLNKNVWVHTEL
Chr.men	----MLKK-IKISLI----LALGLTSLQAFG--Q-----ENPDVKIEKLDKDLNYVYTTY
IMP-1	----MSKLSVFFIFL----FCSIATAAESLP-----DLKIEKLDDEGVYVHTSF
CfiA	----MKTVFILISML----FPVAVMAQKSVK-----ISDDISITQLSDKVYTYVSL
CphA	----MMKGWMKCLAG----AVVLMASFWG-----GSVRAAGMSLITQVSGPVY
L1	MRFTLLAFALVALP----AAHASAAEAPLP-----QLRAYTVDASWLQPMAPLQVAD
	: : : : :
BacII	GYFSGE-AVPSNGLVNLNISKGLVLMVDSSWDDKLTKELEIEMVEKKF--KKRVTDVITHAHA
Chr.men	NTFNGT-KYAANAVYLVTDKGVVVIDCPWGEDKFKSFTEDELYKKH-GKKVIMNLATHSHD
IMP-1	EEVNGWGVVPKHGLVVLVNAEAYLIDTPPTAKDTEKLVWFVER--GYKIKGSISSHFS
CfiA	AETEGWGMVPSNGMIVINNHQAALLDTPINDAQTEMLVNWVWIDSL-HAKVITTFIPNHWHG
CphA	VVEDNY-YVQENSMVYFGAKGVIVVGATWTPDTARELHKLIKRVSR-KPVLVINININHYT
L1	HIWQIG-TEDLTALLVQTAEGAVLLDGGMPQMAGHLLDNMKLRGVAPQDLRLILLSHAHA
	. : : : : *
BacII	DRIGGMKTLKER-GIKAHSTALT-----AELAKRNG---YEEPLGDLQSVIN--
Chr.men	DRAGGLEIFYGKI-GAKTYSTKMD-----SILAKEN-----KPRAYTFDNNKS
IMP-1	DSTGGIEWLNSR-SIPTYASELIN-----ELLKKG---K-VQATNSFSGVN
CfiA	DCIGGLGYLQRK-GVQSYANQMT-----IDLAKEKG---LFPVEHGFIDSLT
CphA	DRAGGNAYWKSI-GAKVSTRQTRDLMKSDWAETVAFTRKGLPEYDPLPLVLPNVVHDGD
L1	DHAGEVAELKRRTGAHVAANAETA-----VLLARGGS---NDLHFGDGITYPPAS
	* * . : * : :
BacII	LKFGNMKVEIFYPG-----KCHIEIENIVVWLPOYQILAGGCIVKSASSKDLGNVAD
Chr.men	FKVKGSEFQVYYPG-----KCHTADNVVWFPEKVLVGGCIKKSADSKDLGYTGE
IMP-1	YWLVKNKIEVFYPG-----PGHTPLNVVWLPERKILFGGCFIKPYG---LGNLGD
CfiA	VSLDGMPLQCYLG-----GGHATDNIVVWLPTENILFGGMLKDNQATSIIGNISD
CphA	FTLQEGKVRAFYAG-----PAHTPDGIFVYFPDEQVLYGNCILKEKL----GNLSF
L1	ADRIIMDGEVVIVGGIAFTAHFMPGHITP-GSTAWTWIDTRDGKPVRIAYADSLSAPGYQL
	. * . * : : :
BacII	AYVNEWSTSIENVLKRYGNIN-----LVVPGHG---EVGDRGLLLHTLDLL--K-----
Chr.men	AYVNDWTQSVHNIQOKFSGAQ-----YVAGHD---DWKDQRSIQHTLDLI--NEYQOKQ
IMP-1	ANIEAWPKSAKLLKSKYGKAK-----LVVPSHS---EVGDASLLKLTLEQA--VKGLNES
CfiA	ADVTAWPKTLDKVKAKFPSAR-----YVVPGHG---DYGGTELIEHTKQIV--NQYIEST
CphA	ADVKAYPQTLERLKAMKLPK-----TVIGGHDS--PLHGPELIDHYEALI--KAAPOS-
L1	KGNPRYPRLIEDYKRSFATVRALPCDLLLTPHPGASNNYAGSKASAEALTCNAYADAA
	: . . : : *
BacII	-----
Chr.men	KASN-----
IMP-1	KKPSKPSN-----
CfiA	SKP-----
CphA	-----
L1	EKKFDAQLARETAGTR

BacII-----*Bacillus cereus* II
 Chr.men---*Chryseobacterium meningosepticum*
 IMP-1-----*P. aeruginosa*, *S. marcescens*等のメタロ-
 β-ラクタマーゼ (主としてプラスミド性)
 CfiA-----*Bacteroides fragilis*
 CphA-----*Aeromonas hydrophila*
 L1-----*Stenotrophomonas maltophilia*

図10. 主なメタロ-β-ラクタマーゼのアミノ酸配列の比較