

this laboratory, that from the University of Geneva and that in the genome project

**Table 1 Bacterial Strains and plasmids**

Strains	Relevant properties
<i>P. aeruginosa</i>	
PAO1-Tokai	Wild-type strain
PAO1-Tokai-#1 to #2	<i>nfxC</i> mutant of PAO1
PAO4290	Leu-10, argF10, aph-9004
PAO4009	Leu-9018, nir-9006, FP5+
KH4014a	<i>nfxC</i> mutant of PAO4009
8380	clinical isolate
8380OCRI01	<i>nfxC</i> -type mutant of 8380
8380-#1 to #4	<i>nfxC</i> -type mutant of 8380
1008	clinical isolate
1008OCRI01	<i>nfxC</i> -type mutant of 1008
1008-#1 to #4	<i>nfxC</i> -type mutant of 1008
PAO1S-Lac	<i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>lacZΔM15</i> , Tc <sup>R</sup>
PAO1S-Lac-#1 to #5	<i>nfxC</i> -type mutant of PAO1S-Lac
<i>E. coli</i>	
DH5α	<i>E. coli</i> strain for transformation
S17-1	Mobilizer strain
Plasmids	
pBluescript II SK(+)	Cloning vector; Amp <sup>r</sup>
pMOB3	pHSS21 derivative carrying MOB cassette; Cm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>
X1918	pUC1918 derivative carrying <i>xylE</i> cassette; Amp <sup>r</sup>

## 2.2. Recombinant DNA techniques

Unless otherwise specified, the recombinant DNA experiments were carried out as described previously. PCR amplification of DNA was carried out using the LA Taq kit (Takara Shuzo, Osaka, Japan). The primers used were as follows: *mexT*-103F (5'-TCGCCATAGGCCGGATAATG-3'), *mexT*-302F (5'-TGCCTGTCAGTGATCCTA TG-3'), *mexT*745F (5'-ACGACGTCGAGTTCGGC CTG-3'), *mexT*994R (5'-TAGTCGTCGAGGGTCAG CTG-3'), *mexT*1414R (5'-ATGGAATAAGCCGCAC ACC-3'), and PO (5'-GGTTGTTTCGATGACTTCGGC-3')

for determining the sequences of *mexT* gene, and *mexT*-Bam (5'-CCGGATCCCCTGGAAACGAGGAAC GCC-3') and *mexT*-Hind (5'-GCAAGCTTCGATGGAATAAGCCGC ACAC-3') to obtain the *mexT*.

## 2.3. Construction of recombinant plasmids

To construct the plasmid carrying the *mexT* gene, approximately 1.0-kbp fragments was amplified using the *mexT*-Bam and *mexT*-Hind as primers and 8380, PAO1-Tokai, and PAO1-Tokai#1 cells as a templates, and inserted into pMMB67EH treated with *Bam* HI and *Hind* III. These recombinant plasmids derived from 8380, PAO1-Tokai, and PAO1-Tokai#1 were designated as pMEXT8380, pMEXTT1, and pMEXTT1C.

## 2.4. Isolation of the *nfxC*-type antibiotic resistant mutants

The *nfxC*-type mutants were selected on the chloramphenicol-impregnated agar plate and followed by the selection for imipenem resistance.

## 2.5. Construction of KH4014a-Δ*mexT*

To obtain a DNA fragment containing the *mexT* gene, a 3-kbp *Apa* I-*Eco* RI fragment, based on our restriction map, was cloned from the genomic DNA of PAO1-Tokai into pBluescript II SK(+) by the hybridisation method and the construct was designated as pRe-AE1. The nucleotide sequence of the cloned *mexT* fragment was confirmed as identical with that in PAO1-Tokai.

To construct the pMexT::xylE-MOB, we inserted *xylE* from X1918 at the *Bgl*II site in *mexT* and the MOB cassette from pMOB3 at *Not*I site on pRe-AE1 plasmid. To construct KH4014a-Δ*mexT*, the pMexT::xylE-MOB was transferred to strain KH4014a by conjugation as reported earlier.

## C. 研究結果

### 3.1. Frequency of *nfxC*-type mutation in the laboratory stock wild-type strains

The *nfxC*-type mutation appeared from PAO1-Tokai in a frequency of  $2 \times 10^{-10}$  whereas the mutant could not be isolated

from PAO4290 and PAO4009. The isolation frequency from 8080, 1008 and PAO1S-Lac was  $\sim 1 \times 10^{-8}$ ,  $\sim 2 \times 10^{-8}$  and  $\sim 2 \times 10^{-7}$ , respectively. These results showed that isolation frequency of *nfxC*-type mutation varies orders of

magnitude from a strain to another. All the mutants showed characteristic antibiotic resistance profile of the *nfxC*-mutant (Table 2). We classified the wild-type

Table 2. Antibiotic susceptibility of *P. aeruginosa* used in this study \*

strain	type	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
		CP	NFLX	TET	IPM
PAO1-Tokai	wt	50	0.78-0.39	25	0.78
PAO1-Tokai-#1 to #2	<i>nfxC</i>	>800	6.25	50	3.13
PAO4290	wt	50	0.78	25	1.56
PAO4009	wt	50	0.78	25	0.78
KH4014a	<i>nfxC</i>	>800	12.5	50	3.13
8380	wt	400-200	0.78	50	0.78
8380-#1 to #4	<i>nfxC</i>	>800	12.5	50	6.25
8380-OIR01	<i>nfxC</i>	>800	12.5	50	6.25
1008	wt	200-100	0.39	50	1.56-0.78
1008-#1 to #4	<i>nfxC</i>	>800	12.5	100-50	6.25-3.13
1008-OIR01	<i>nfxC</i>	>800	12.5	100	6.25
PAO1S-Lac	wt	50	0.78	>100	1.56
PAO1S-Lac-#1 to #5	<i>nfxC</i>	>800	12.5-6.25	>100	6.25-3.13

strains into three groups in terms of the frequency of *nfxC*-type mutation as follows. Type I included PAO1-Tokai, PAO4290, PAO4009 with a frequency of  $\sim 2 \times 10^{-10}$ , type II for PAO1S-Lac with a frequency of  $\sim 2 \times 10^{-7}$  and type III including 8380 and 1008 with a frequency of  $\sim 1 \times 10^{-8}$ . The frequency in type III was consistent with that reported earlier.

### 3.2. Sequences of the chromosomal *mexT* gene in the strains PAO1-Tokai, PAO4290, PAO4009 and their derivatives

A conceivable possibility for different frequency of the *nfxC*-type mutation would be that *mexT* in a particular

strain differs from that of another. In order to clarify this ambiguity, we determined the sequences of the chromosomal *mexT*. We found that all the strains had a C to G substitution at the 76<sup>th</sup> nucleotide, compared with PAO1-Genova (Fig. 1). In addition, *mexT* in PAO4009 had a G to T base substitution at the 91<sup>st</sup> nucleotide, and PAO4290 had a base deletion (A) at the 413<sup>th</sup> nucleotide. Consequently, PAO4009 and PAO4290 produced truncated (at amino acid 31<sup>st</sup>) and out-of-frame (at the 138<sup>th</sup> amino acid) MexT, respectively. These data suggest that the difficulty in isolating the *nfxC*-type mutant in these strains is most likely due to dysfunction of the positive

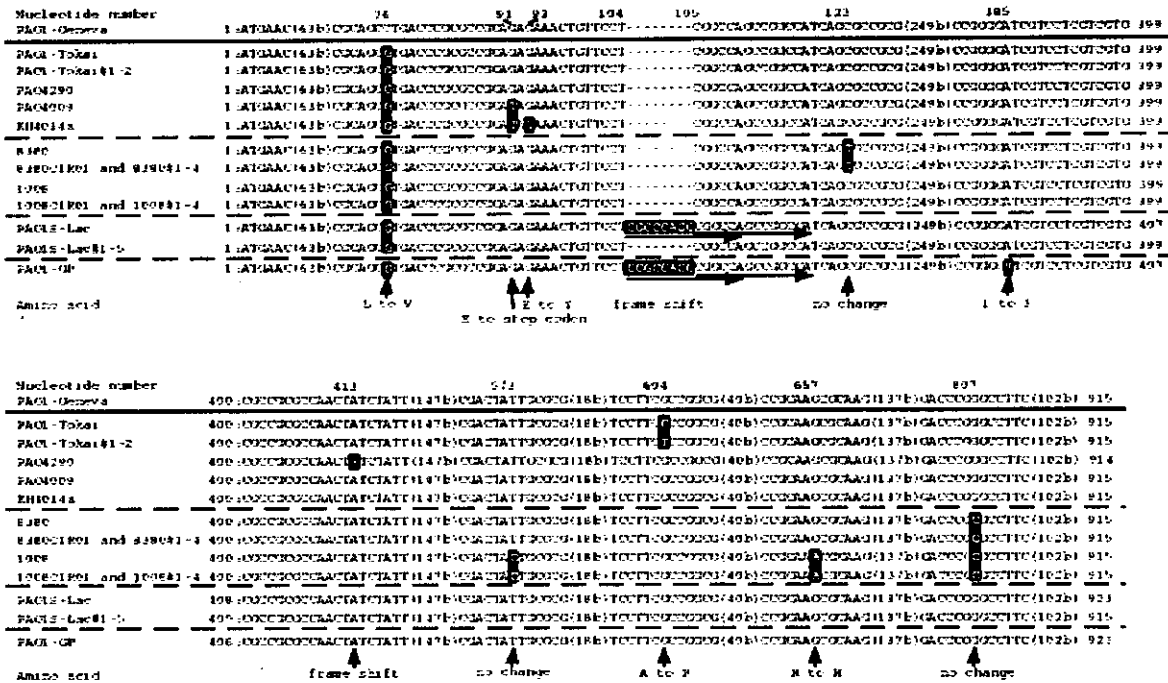


Fig. 1. Alignment of the nucleotide sequence of *mexT* of the strains used in this study. Amino acid was indicated by a vertical arrow at the bottom lines. An horizontal arrow indicated a direct repeat. The nucleotide sequence of *mexT* of PAO1-Geneva appear in DDBJ database under an accession number AJ007825.

regulator, MexT. The *nfxC* mutant originally isolated by Fukuda et al., KH4014a, had a G to T substitution at the 93<sup>rd</sup> nucleotide changing the stop codon in the parent strain, PAO4009, to tyrosine. We assume that *nfxC* gene defined by Fukuda et al might be the *mexT* gene based on the following reasons. (i) The *nfxC* gene was mapped between 46 min. (*cataI*) and 48 min. (*mtu-9020*). The *mexT* gene is located within 18 kbp toward *mtu-9020* from *cataI* gene. (ii) Inactive *mexT* in PAO4009 was changed to active *mexT* in KH4014a. (iii) The KH4014a- $\Delta$ *mexT* exhibited the phenotype of PAO4009 (Table 3). On the other hand, *mexT* in PAO1-Tokai had G to C substitution at 604<sup>th</sup> nucleotide resulting in alanine to proline substitution at the 202<sup>nd</sup> residue. Nucleotide sequencing of *mexT* in two *nfxC*-type mutants from this strain appeared that they had a C to T substitution at the 604<sup>th</sup>, changing proline (at the 202<sup>nd</sup> residue) to serine. To test whether or not MexT of PAO1-Tokai functions properly, we deleted chromosomal *mexT* in KH4014a and introduced *mexT* of

PAO1-Tokai and PAO1-Tokai#1. The transformants with *mexT*(PAO1-Tokai) showed neither the *nfxC*-phenotype nor the MexEF-OprN pump expression

Table 3. Antibiotic susceptibility of the strains to be tested the function of the *mexT* gene<sup>a</sup>

strain	plasmid	MIC ( $\mu$ g/ml)		
		NFLX	CP	IPM
PAO4009	-	0.78	100	0.78
KH4014a	-	12.5	>800	3.13
KH4014a- $\Delta$ <i>mexT</i>	-	0.78	100	0.78
KH4014a- $\Delta$ <i>mexT</i>	pMMB67EH	0.78	100	0.78
KH4014a- $\Delta$ <i>mexT</i>	pMEXT8380	12.5	>800	3.13
KH4014a- $\Delta$ <i>mexT</i>	pMEXTT1	0.78	100	0.78
KH4014a- $\Delta$ <i>mexT</i>	pMEXTT1C	12.5	>800	3.13
8380	-	0.78	400-200	0.78
8380	pMMB67EH	0.78	400-200	0.78
8380	pMEXT8380	3.13	800	1.56
8380-#1	-	12.5	>800	6.25

<sup>a</sup> Abbreviations: CP, chloramphenicol; NFLX, norfloxacin; IPM, imipenem.

demonstrating that MexT(PAO1-Tokai) was inactive, whereas the transformants with *mexT*(PAO1-Tokai#1) exhibited the *nfxC*-phenotype (Table 3) verified that MexT(PAO1-Tokai#1) was active. These results indicated that a low frequency of the *nfxC*-phenotype in PAO1-Tokai, PAO4009,

and PAO4290 is attributable to inactive MexT. This is the first report that the sequence of

*mexTs* in the *nfxC*-type mutant differs from that of the wild-type strain.

### 3.3. Sequence of *mexT* of PAOIS-Lac and PAO1-GP

The nucleotide sequencing of *mexT* in PAOIS-Lac and PAO1-GP revealed that these particular *mexTs* had an 8-bp nucleotide insert at the 104<sup>th</sup> position resulting in an out-of-frame sequence. All the *nfxC*-type mutants derived from these parents had an 8-bp-deletion, which was originally inserted in the parent *mexT* gene, resulting in reversion of the non-sense *mexT* to the sense open reading frame. We found a 14 bp-direct repeat, from which the 8-bp-insert had been deleted in the *nfxC*-type mutants.

### 3.4. Sequence of *mexT* in 8380 and 1008

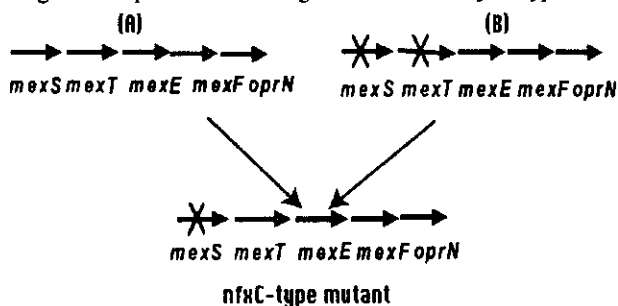
Analyses of *mexTs* in the *nfxC*-type mutants derived from strains 8380 and 1008 showed identical nucleotide sequence with that of the respective parent strain (Fig. 1). These *mexT* genes were unimpaired because KH4014a- $\Delta$ *mexT* transformed with *mexT*(8380) exhibited the *nfxC*-phenotype (Table 3). The results are consistent with the sequence analysis of *mexT* in the *nfxC*-type mutant derived from PAO1-Geneva suggesting that the *nfxC*-type mutant must have an additional mutation as pointed earlier.

## D. 考察

This paper reported that there are at least three types of the wild-type strain in terms of the frequency of the *nfxC*-type mutation. This variation was attributable to the chromosomal aberration on the *mexT* gene. If the *mexT* gene was inactive, frequency of *nfxC*-type mutation was  $2 \times 10^{-10}$  as in the type-I strains, or higher than  $10^{-7}$  in the type-II strains. Type-III strains had active *mexT* and the frequency of *nfxC*-type mutation was  $\sim 10^{-8}$ . What could be the mechanism to generate the *nfxC*-type

mutants from type-III strain. One possibility would be as suggested by Köhler et al that a quantitative difference of a putative effector might be involved in the expression of *nfxC*-type phenotype. We propose an alternative hypothesis that an

Fig. 2. Proposed model for generation of the *nfxC*-type



mutant

The Type-III strains seem to have both healthy *mexT* and *mexS* and a mutation(s) in *mexS* generates the *nfxC*-type antibiotic resistant strain. The Type-I and -II strains may have a mutation(s) in both *mexT* and *mexS*, and reversion of *mexT* to produce active MexT results in the *nfxC*-type antibiotic resistance. For details, see text.

unidentified suppressor (tentatively designated as *mexS* in this paper) acting on *mexT* had a mutation(s) rather than quantitative difference of an unknown effector (Fig. 2). Lines of evidence to support this notion are as follows. (i) The *nfxC*-type mutant appeared higher frequency in type III than in the type I strains because the former needs only a mutation in *mexS* but the latter requires functional reversion of *mexT*. (ii) Overexpression of *mexT* (8380) on the plasmid in the 8380 strain resulted in the *nfxC*-phenotype. (Table 3). This result suggests that *mexT* encodes active protein but expression of *mexT* in 8380 may be suppressed by MexS. Therefore, there are two types of wild-type strains, in which the *mexEF-oprN* operon was suppresses under normal growth conditions (Fig. 2). One group of the strains produces both inactive MexT and MexS resulting in undetectable expression of MexEF-OprN (Fig. 2). To express the *nfxC*-phenotype, these strains should have reversion of inactive MexT to the active one. Another group of strains produce both active MexT and MexS. The MexS suppresses the function of MexT, which regulates the *mexEF-oprN* operon

expression. To express the *nfxC* phenotype, these strains needed to have mutation in *mexS*.

#### E. 結論

We found three types of wild-type strains in terms of the *mexT* gene mediated regulation of the MexEF-OprN efflux pump, of which overexpression causes the *nfxC*-type antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Type-I: The *mexT* gene of the wild-type strain encoded inactive MexT and the *nfxC*-type mutants derived from this parent had an additional mutation in *mexT* converting MexT from inactive to active form. Type-II: The *mexT* gene in the wild-type strain had an 8-bp-insert producing inactive MexT and the *nfxC*-type mutants from this parent had a deletion of the 8-bp-insert converting inactive MexT to active form. Type-III: Both the wild-type strain and its *nfxC*-type derivative produced identical and active MexT. The *nfxC* mutant from this parent must have an additional mutation. The original *nfxC* mutant isolated in 1990 might be derived from the Type-I parent strain.

#### F. 研究発表

Yoneyama, H. Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA,B-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 4628-463, 2000

Maseda, H. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 658-664, 2000

Nakajima, A. Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump

in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 275, 30064-30068, 2000

Maseda, H.. Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression, in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Letts.* 192, 107-112, 2000

Nakae, T. Effect of sulbactam on anti-pseudomonal activity of beta-lactam antibiotics in cells producing various levels of the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. *Microbiol. Immunol.* 44, 997-1001, 2000

#### G. 学会発表

学会発表は省略

#### Figure legends

Fig. 1. Alignment of the nucleotide sequence of *mexT* of the strains used in this study

Amino acid was indicated by a vertical arrow at the bottom lines. An horizontal arrow indicated a direct repeat. The nucleotide sequence of *mexT* of PAO1-Geneva appear in DDBJ database under an accession number AJ007825.

Fig. 2. Proposed model for generation of the *nfxC*-type mutant

The Type-III strains seem to have both healthy *mexT* and *mexS* and a mutation(s) in *mexS* generates the *nfxC*-type antibiotic resistant strain. The Type-I and -II strains may have a mutation(s) in both *mexT* and *mexS*, and reversion of *mexT* to produce active MexT results in the *nfxC*-type antibiotic resistance. For details, see text.

*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)の新規マルチコンポーネント型排出システム MexX-MexY の OprM との共同作業ならびに抗菌薬自然耐性への貢献

分担研究者 後藤 直正 京都薬科大学 微生物学教室

*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)の染色体上にコードされた新規排出システム MexX-MexY の性状を明らかにすることを行ったところ、PAO1 株のような野生株で発現している MexA-MexB-OprM の外膜コンポーネント OprM が MexX-MexY と機能的に共同作業していることが分かった。また、MexX-MexY は、野生株では発現せず、エリスロマイシン、テトラサイクリンやゲンタマイシンなどの存在によりその発現が一過的に誘導され、キノロン薬、一部のβ-ラクタム薬、テトラサイクリン、エリスロマイシン、アミノ配糖体薬の菌体外への排出に働くことが分かった。これらの結果は *P. aeruginosa* の抗菌薬に対する *in vitro* 感受性と感染部位での感受性が異なる可能性を示すものであり、臨床での抗菌治療薬の選択に新たな問題を提起するものである。

#### A. 研究目的

*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)の染色体上には内膜コンポーネント、外膜コンポーネントおよびペリプラスムコンポーネントから形成されるマルチコンポーネント型多剤排出システムが少なくとも 3 種類 (MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN) コードされ、それぞれの発現は、それ毎に特徴的な抗菌薬多剤耐性プロファイルをもつ *P. aeruginosa* に付与する。最近、国内外の研究グループから、本菌の新規なマルチコンポーネント型排出システムをコードするオペロン *mexX-mexY* (岡山大学土屋グループ)、*mexG-mexH* (Plesiat, France) および *amrA-amrB* (Westbrock-Wadman, USA) が報告された。これらの DNA 塩基配列はきわめて類似し、*Pseudomonas genome sequencing project* ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com))でのデータベースを用いたホモロジーサーチでも同じオペロ

ンであることが示唆されたことから、*mexX-mexY* と統一された。このオペロンには、既報の排出システムをコードするオペロンとは異なり、特定の外膜コンポーネントがコードされていないが、*P. aeruginosa* の野生株で発現している OprM と共同して機能していることが示唆されている。本排出システムによる *P. aeruginosa* の多剤耐性化を調べる目的で、*mexA-mexB-oprM* および *mexX-mexY* の遺伝子群を欠失した変異株シリーズを作成し、その耐性プロファイルの変化を調べた。さらに、MexX-MexY の各コンポーネントに特異的な抗体を作成し、その排出システムの発現を調べた。

#### B. 研究材料と方法

##### 1) 使用菌株およびプラスミド

実験に使用した菌株はすべて *P. aeruginosa* PAO1 の変異株である。

表1 *P. aeruginosa* PAO1とそのIsogenic mutantsの抗菌薬感受性

	AB	XY	M	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
				OFLX	TC	EM	GM	SM
PAO1	+	+	+	0.5	16	256	1	16
N101	+	$\Delta$	+	0.25	2 (1/8)	64 (1/4)	0.13 (1/8)	2 (1/8)
KG2225	$\Delta$	+	+	0.13 (1/4)	2 (1/8)	64 (1/4)	1	
N102	$\Delta$	$\Delta$	+	0.03	0.5	32	0.13	
KG2239	$\Delta$	+	$\Delta$	0.03	0.5	16	0.25	2
N103	$\Delta$	$\Delta$	$\Delta$	0.03	0.25	16	0.25	2
KG2239/pKMM128	$\Delta$	+	+	0.13	8	64	1	16
N103/pKMM128	$\Delta$	$\Delta$	+	0.03	0.13	16	0.13	2

+, expression;  $\Delta$ , deletion.

OFLX, ofloxacin; TC, tetracycline; EM, erythromycin; GM, genetamicin; SM, streptomycin.

## 2) DNA 組み換え操作

すでに確立した方法により行った。*mexX-mexY* 領域の欠失は、*Pseudomonas* genome sequencing project のデータベースより得たこの領域を含む配列から *mexX* の上流および *mexY* の下流を PCR 増幅し、その増幅された断片を *mexX-mexY* 領域が欠失するようにライゲーションした後、ノックアウト用のプラスミドを既報のように作成した。得られたプラスミドを *E. coli* S17-1 に導入後、*P. aeruginosa* との接合により目的とした領域を欠失し。さらにプラスミドの脱落した変異株を選択した。

## 3) 特異抗体の作成とイムノプロット法

*MexX* および *MexY* に対する抗体は、それぞれの遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列をもとに抗原性が期待できる領域に応じたポリペプチドを合成した。それらのポリペプチドでウサギを免疫することにより、ポリクロナルペプチド抗体を作成した。イムノプロット法はすでに報告したように行った。

## 4) 抗菌薬感受性測定 (MIC 測定)

Muller-Hinton 培地を用いた寒天平板希釈法に

より行った。

## C. 結果および考察

### 1) *MexX-MexY* と共同作業する外膜コンポーネントの同定

表1に示すようにPAO1株のisogenic mutant シリーズの抗菌薬感受性を比較した。*MexX-MexY* が *OprM* と共同作業し、オフロキサシン、テトラサイクリン、エリスロマイシンおよびゲンタマイシンに対する耐性化に働いていることは、KG2225 と N103 の感受性の比較から示唆された。また、この結果は KG2239/pKMM128

### Anti-*MexX* pAb

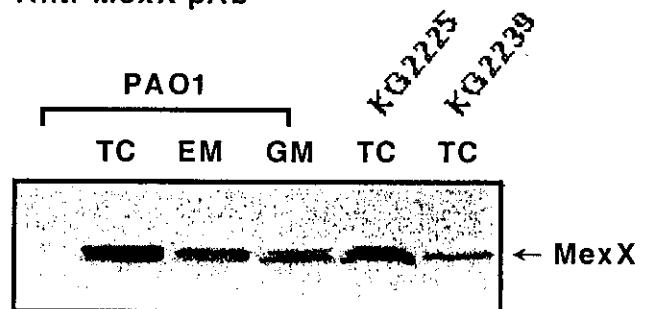


図1 抗*MexX*抗体を用いたイムノプロット (*oprM*)の結果からも明らかであった。一方、PAO1からの *mexX-mexY* の欠損(N101)によってはオ

表2 *P. aeruginosa* PAO1とそのisogenic mutantsの抗菌薬感受性

		MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
		OFLX	CPFX	SPFX
PAO1		0.25	0.06	0.5
N101	MexAB-OprM $\Delta$ MexXY	0.25	0.03	0.25
N135	Constitutive MexXY	2	0.25	2
N136	$\Delta$ MexXY from N135	0.25	0.03	0.13

フロキサシンの感受性はほとんど変化しなかった。これは、先ほどの結果と矛盾する結果であった。

つぎに、新たに作成した MexX および MexY 抗体を用いたイムプロットを行ったところ、MexX-MexY は野生株では発現せず、エリスロマイシン、テトラサイクリンやゲンタマイシンの存在下で発現することが分かった (図1)。

### 2) MexX-MexY/OprM のキノロン薬に対する働き

表 2 に示すようにさらに変異株シリーズを作成し、MexX-MexY/OprM がキノロン薬耐性に働くかどうかを調べた。PAO1 からの MexX-MexY の欠損(N101)は前項で述べたようにキノ

ロン薬(オフロキサシン、シプロフロキサシン、スパルフロキサシン)に対する感受性をほとんど上昇させなかったが、MexX-MexY の構成的変異株(N135)ではこれらのキノロン薬に対する耐性が観察された (表 2)。さらに、N135 から MexX-MexY の欠失は N135 で観察されたキノロン薬耐性を消失させた。こうして、MexX-MexY-OprM が

### 3) MexX-MexY の一過的な発現誘導

エリスロマイシンの作用時の 3) MexX-MexY の発現を調べた。その結果は図 2 に示されている。400  $\mu\text{g/ml}$  のエリスロマイシンの作用は PAO1 の増殖に影響を与えたが、作用 20 時間目

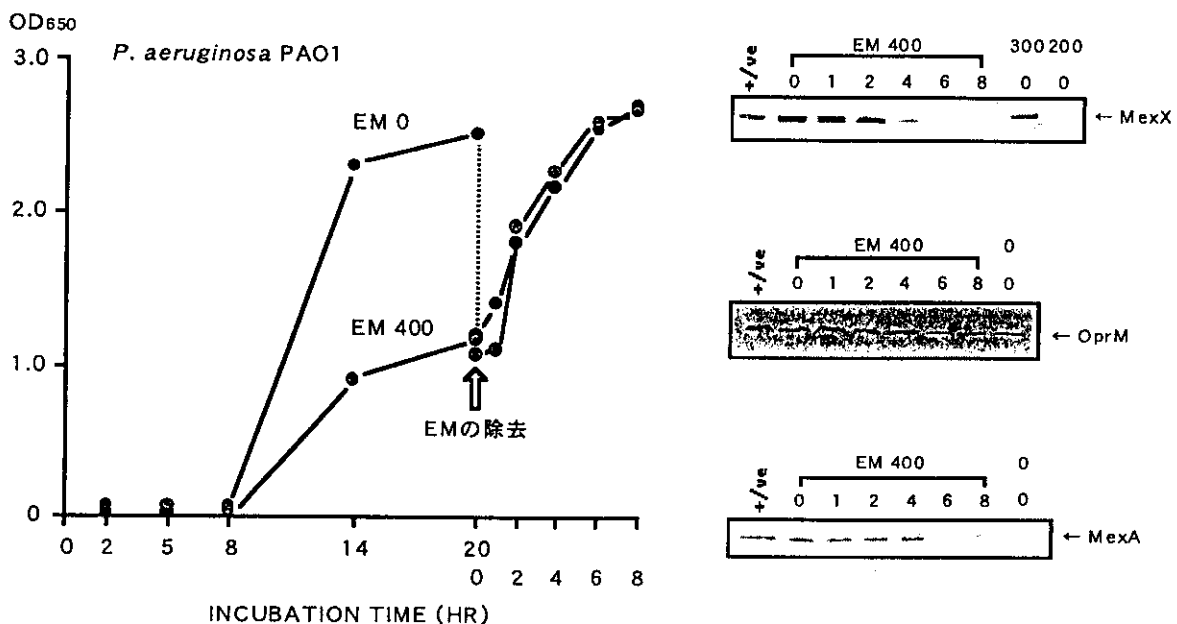


図2 エリスロマイシンによるMexXY/OprMの一過的な発現誘導



での遠心洗浄によるエリスロマイシンの除去はエリスロマイシンを作用させていない細胞と同じように増殖を開始し、エリスロマイシンの作用による増殖阻害は長くは続かなかった。イムノプロットでの観察では、エリスロマイシンの作用により、MexX の発現が誘導されることを示したが、エリスロマイシンの除去により、その発現量は経時的に減少し、4 時間目で検出限界以下となった。

こうして、MexX-MexY の発現がエリスロマイシンなどの抗菌薬の作用によって一過的に起こることが明らかとなった。このような排出システムの誘導的発現現象は始めての結果であると同時に、*P. aeruginosa* の *in vitro* 感受性と感染部位での感受性が異なる可能性を示している。そして、円滑な化学療法の推進のために臨床分離株での MexX-MexY の発現動向について注意する必要性が示された。

#### D. 結論

- 1) MexX-MexY は、PAO1 株のような野生株で発現している外膜コンポーネント OprM と機能的に共同作業している。
- 2) MexX-MexY は、野生株では発現せず、エリスロマイシン、テトラサイクリンやゲンタマイシンなどの存在によりその発現が一過的に誘導される。
- 3) 発現した MexX-MexY/OprM は、キノロン薬、一部の  $\beta$ -ラクタム薬、テトラサイクリン、エリスロマイシン、アミノ配糖体薬の菌体外への排出に働いている。

#### 研究発表（印刷物のみに限った）

1. 後藤直正. 2000. 細菌の異物（薬剤）排出蛋白質と抗菌薬耐性. 日本化学療法学雑誌,

48:509-515.

2. Shah Jalal, Oana Ciofu, Niels HØiby, Naomasa Gotoh, and Bengt Wretling. 2000. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:710-712.
3. Nobuhisa Masuda, Eiko Sakagawa, Satoshi Ohya, Naomasa Gotoh, Hideto Tsujimoto, and Takeshi Nishino. 2000. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:2242-2246.
4. Nobuhisa Masuda, Eiko Sakagawa, Satoshi Ohya, Naomasa Gotoh, Hideto Tsujimoto, and Takeshi Nishino. 2000. Substrate specificity of the MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:3322-3327.
5. Nobuhisa Masuda, Eiko Sakagawa, Satoshi Ohya, Naomasa Gotoh, and Takeshi Nishino. 2001. Hyper-susceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* mutant to  $\beta$ -lactams due to reduced expression of AmpC  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, in press.

# グリコペプチド耐性黄色ブドウ球菌の検出法と耐性遺伝子検査技術の開発

分担研究者 和田昭仁 国立感染症研究所 細菌部

黄色ブドウ球菌のグリコペプチド耐性、特にテイコブラニンに耐性を与える遺伝子として、*tcaRAB* オペロンを同定し、COL 株と、NCTC8325 株由来の BB255 においてこのオペロン変異が薬剤耐性に与える影響を解析し、以下の結果を得た。COL の *tcaA* のトランスポゾン挿入変異株、ならびに *tcaRAB* null 変異株は、テイコブラニンの MIC が 8–12 mg/L となり、親株の MIC 3 mg/L から比べ、3–4 倍の上昇が見られた。しかし、これらの変異を NCTC8325 由来の BB255 に導入しても、テイコブラニンの MIC 上昇は、1.5 mg/L から 3 mg/L と 2 倍にとどまった。*tcaRAB* の相補実験により、この遺伝子のうちのどれがテイコブラニン耐性にもっとも影響を与えるか、また、複数の変異の組み合わせにより、テイコブラニン、バンコマイシンの耐性度がどの程度変化するかを調べる必要がある。

## A. 研究目的

黄色ブドウ球菌は市中、院内感染の主要な起炎菌であり、なかでもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、医療上深刻な問題をもたらしてきた。1997 年に、バンコマイシン低感受性 MRSA の分離症例が初めて報告され、今後、このような菌の分離症例が増えることが懸念される。しかし、バンコマイシンの MIC 4 mg/L を示す菌は、その耐性度が不安定であり、hetero VRSA として提唱されている菌も、その遺伝的背景は明らかでない。私は、今までに、黄色ブドウ球菌のグリコペプチド耐性、特にテイコブラニン耐性の原因遺伝子をクローニングする目的で、遺伝学的解析を行い、黄色ブドウ球菌のテイコブラニン耐性に影響を与える遺伝子は、染色体上に少なくとも 2 つ以上存在し (それぞれ、*Sma*I-D と *Sma*I-L DNA 断片の接合部周辺、*Sma*I-I の断片上)、ともに感受性優位に働いていると考えられる知見を前年度までに得た。そこで、平成 12 年度は、黄色ブドウ球菌のテイコブラニンに耐性を与え

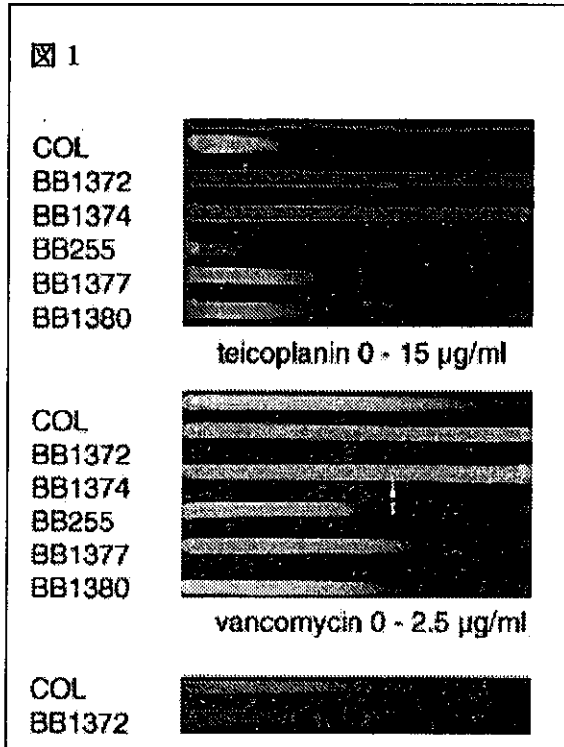
る遺伝子の同定、クローニングを目的として研究を行った。

## B. 研究方法

黄色ブドウ球菌の標準株として、NCTC8325 (メチシリン感受性黄色ブドウ球菌[MSSA])、COL (MRSA) を用いた。これらの菌のゲノムシーケンスの一部は各々、<http://www.genome.ou.edu/>、<http://www.tiger.org/> で公開されている。染色体上の遺伝子を破壊する目的で、erythromycin 耐性マーカーを持つ Tn917 が乗っている温度感受性プラスミド pTV32 を用いた。5 mg/L のテイコブラニンを含む BHI プレートに、Tn917 の染色体挿入ライブラリーの菌を塗り、ここに生育した株のうちの 2 株 BB1372 と BB1374 の解析を行った (3)。Tn917 により破壊された遺伝子のシーケンスを、染色体 DNA を template として直接決定した (1)。

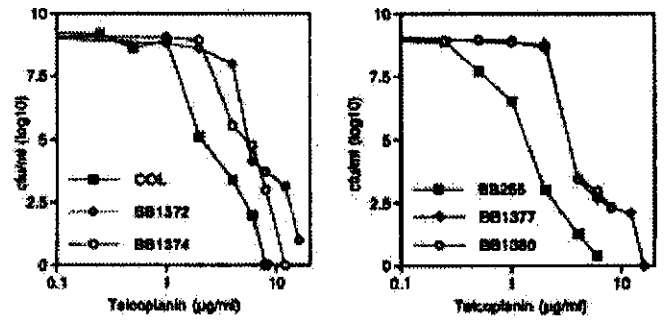
### C. 結果

BB1372 と BB1374 の耐性度を知るために行ったグラジエントプレート解析の結果を図 1 に示す。



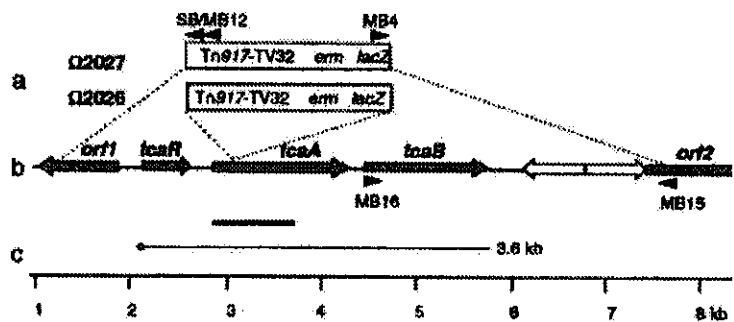
BB1372 と BB1374 は親株の COL に比べてテイコブラニンの耐性度が 3-4 倍上昇したが (3 mg/L から 8-12 mg/L)、バンコマイシンの MIC に変化はなかった。しかし、図 1 に示すようにグラジエントプレートによる解析ではわずかな耐性度の上昇を観察することができた。これらの挿入を NCTC8325 株からペニシリナーゼプラスミドを除いた株 BB255 に導入し、親株との耐性度を比較したが、テイコブラニンに対する耐性度の上昇は 2 倍にとどまった (1.5 mg/L から 3-4 mg/L)。また、BB1372 では、メチシリンに対する耐性度も低下していた。ポピュレーション解析の結果を図 2 に示す。

図 2



横軸は対数目盛りでテイコブラニンの濃度を示している。BB1372 と BB1374 では、ポピュレーションのうちのほとんど全部が生育できるテイコブラニン濃度が、COL のそれに対して顕著に上昇していた。Tn917 の内部に相当するシーケンスをプライマーとして、BB1372 と BB1374 での Tn917 挿入部位の近傍の塩基配列を直接決定したところ、BB1372 では欠失挿入 ( $\Omega$ 2027)、BB1374 では、BB1372 で欠失していた遺伝子のうちの 1 つのリーディングフレーム内への挿入 ( $\Omega$ 2026) が起こっていた (図 3)。

図 3



これらの挿入が起こった遺伝子群はその配列からオペロンを形成していることが予想され、Northern 解析でもこの考え方は支持された。これらの遺伝子をそれぞれ、上流から *tcaR*, *tcaA*, *tcaB* と名づけた。また、PFGE 解析により、これらの遺伝子は NCTC8325 の *Sma*I-C 断片に相当する位置に存在することが分かった。

#### D. 考察

TcaR は転写制御因子である MarR に属する *B.*

*subtilis* の ORF と 54%の相同性を示した。また、TcaAB は、bicyclomycin 耐性遺伝子耐性遺伝子と 65%の相同性を示した。テイコプラニンと bicyclomycin では類似構造を認めることができず、また、黄色ブドウ球菌は bicyclomycin に自然耐性であるため *tcaRAB* 変異株で bicyclomycin の耐性度の変化を見ることはできなかった。BB1374 の挿入部位を考えると、観察されたテイコプラニンの耐性度上昇は *tcaA* の変異によるものである可能性が高いが、詳細を明らかにするには相補実験を行う必要がある。また、TcaA の局在、およびテイコプラニン耐性機序は依然不明のままであり、これらの解析のためには、抗 TcaA 抗体作成、何らかの標識テイコプラニンを作成することが必要である。また、前年度までに行った遺伝学的解析により、テイコプラニンの耐性に影響を与える因子は、染色体 *Sma*I-I 断片と *Sma*I-D/L 断片接合部周辺に位置していることが予想されているが、今回、破壊株を得た *tcaRAB* は、染色体 *Sma*I-C 断片に存在するため、新たな耐性原因遺伝子の探索が必要である。臨床の上、MRSA 感染症治療にはテイコプラニンよりもバンコマイシンのほうが用いられることが多く、*tcaRAB* に加えて、どの遺伝子がバンコマイシン感受性により多く影響を与えるかの解析も行う必要がある。

#### E. 結論

黄色ブドウ球菌 COL(MRSA)の染色体 *Sma*I-I 断片に存在する、*tcaRAB* の挿入変異株においては、テイコプラニンに対する耐性度が 3-4 倍程度上昇していたが、バンコマイシンに対する耐性度はの上昇はわずかであり、MIC の変化として捕らえることはできなかった。またこの挿入変異を NCTC8325(MSSA)由来の BB255 に導入しても、テイコプラニンに対する耐性度の変化は 2 倍にとどまった。

#### F. 論文発表/参考文献

1. Wada, A. An improved method for purifying bacterial genomic DNAs for direct sequencing by capillary automated sequencer. Technical Tips on Line. <http://research.bmn.com/tto> (2001) 1:T02049.
2. Bischoff, M., Roos, M., Putnik, J., Wada, A., Glanzmann, P., Giachino, P., Vaudaux, P., Berger-Bächi, B. Involvement of multiple genetic loci in *Staphylococcus aureus* teicoplanin resistance. FEMS Microbiol. Lett. (2001) 194:77-82.
3. Brandenberger, M., Tschierske, M., Giachino, P., Wada, A., Berger-Bächi, B. Inactivation of a novel three-cistronic operon *tcaR-tcaA-tcaB* increases teicoplanin resistance in *Staphylococcus aureus*. Biochim. Biophys. Acta (2000) 1523:135-139.
4. Randegger, C., Keller, A., Irla, M., Wada, A., Haechler, H. Contribution of Natural Amino Acid Substitutions in SHV Extended-Spectrum beta-Lactamases to Resistance against Various beta-Lactams. Antimicrob. Agents Chemother. (2000) 44:2759-2763.
5. Arai, S., Konda, T., Wada, A., Matsunaga, Y., Nobuhiko, O., Watanabe, H., Inouye, S. Use of antiserum-coated latex particles for serotyping *Streptococcus pneumoniae*. Microbiology and Immunology. (2001) 45:159-162.

## 厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）

### 分担研究報告書

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

分担研究者 山本友子（千葉大学薬学部薬効・安全性学講座微生物薬品化学研究室）

**研究要旨** 我が国におけるマクロライド系抗菌薬耐性グラム陰性菌の出現状況を調査し、さらに耐性遺伝子の種類と耐性機構を検討した。1997年臨床分離大腸菌 500 株のうち 2.6%がマクロライド高度耐性菌であった。保有する耐性遺伝子は保有する耐性遺伝子は *mphA* (ML-2'リン酸化酵素 I 型) 2 株、*mphB* (ML-2'リン酸化酵素 II 型) 1 株、*ereB* (エステラーゼ) 2 株、*ereB/ermB* (メチラーゼ) 1 株であった。一方、1997年臨床分離緑膿菌 300 株のうち 0.9%がマクロライド高度耐性菌であった。保有する耐性遺伝子は *mphA* (ML-2'リン酸化酵素 I 型) 2 株であり、日本で該耐性遺伝子が緑膿菌で分離されたのはこれがはじめてである。1986年臨床分離マクロライド耐性菌の出現頻度に比較し（大腸菌 0.5%、緑膿菌 0%）、明らかに増加していることが明らかとなった。さらに ML-2'リン酸化酵素 I 型の反応機構を明らかにするために、緑膿菌由来の本酵素の活性中心を明らかにした。

#### A. 研究目的

マクロライド系抗菌薬は、従来ブドウ球菌をはじめとするグラム陽性菌による感染症に対し用いられてきたが、最近、緑膿菌を起因菌とする難治性慢性呼吸器感染症のひとつである慢性汎細気管支炎に有効とされ、長期投与されることから、高度耐性菌の出現が危惧されている。そこで本研究では、我が国におけるマクロライド耐性グラム陰性菌の出現状況を調査しさらに、耐性遺伝子の種類と耐性機構を検討した。

#### B. 研究方法

1997年の我が国の臨床分離大腸菌 500 株ならびに臨床分離緑膿菌 300 株について、日本化学療法学会規定に基づき、各種マクロライド系抗菌薬に対する MIC を測定した。既知のマクロライド耐性遺伝子の塩基配列を基に、PCR プライマーを作成し、耐性遺伝子の検出を行った。さらに ML-2'リン酸化酵素 I 型遺伝子への部位特異的変異の導入は、ODA-LA PCR 法により行った。

#### C. 研究結果と考察

1997年臨床分離大腸菌 500 株のうち 2.6%がマクロライド高度耐性菌であった。保有す

る耐性遺伝子は保有する耐性遺伝子は *mphA* (ML-2'リン酸化酵素 I 型) 2 株、*mphB*(ML-2'リン酸化酵素 II 型) 1 株、*ereB* (エステラーゼ) 2 株、*ereB/ermB* (メチラーゼ) 1 株であった。一方、1997 年臨床分離緑膿菌 300 株のうち 0.9% が ML 高度耐性菌であった。保有する耐性遺伝子は *mphA* (ML-2'リン酸化酵素 I 型) 2 株であった。ML-2'リン酸化酵素 [MPH(2')] は、ATP の  $\gamma$ -リン酸基をマクロライドの 2'-OH 基へ転移させて不活化する。活性アミノ酸残基を解析した結果、MPH(2')I の活性発現には 198 位のヒスチジン、241 位のグルタミン酸が必須であることが明らかとなった。さらに、205 位のヒスチジン、222 位のグルタミン酸がマクロライドの認識に関与することが明らかとなった。

#### D. 結論

1997 年臨床分離緑膿菌由来のマクロライド高度耐性菌の耐性の原因は、ML-2'リン酸化酵素 I 型) であったが、日本で該耐性遺伝子が緑膿菌で分離されたのはこれがはじめてである。1986 年臨床分離 ML 耐性菌の出現頻度に比較し (大腸菌 0.5%、緑膿菌 0%)、明らかに増加していることが明らかとなった。又、この耐性遺伝子はプラスミド性であった。現在のところ ML-2'リン酸化酵素によるグラム陰性耐性菌の報告数は少ないが、確実に増加してきている上、まだ臨床で使用されていないテリスロマイシンを不活化するなど、今後のマクロライドによる治療の妨げになると予想される。

#### E. 研究発表

学会発表

都澤いずみ、中村昭夫、澤井哲夫、山本友子、小原康治。マクロライド 2'-リン酸化酵素 I 型におけるヒスチジン残基の役割。第 83 回日本細菌学会関東支部総会

## 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

### 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 群馬大学医学部 教授

分担研究者 井上松久・北里大学  
医学部・教授

#### A. 研究目的

$\beta$ -ラクタム薬耐性の主因となる $\beta$ -ラクタマーゼは、そのアミノ酸一次配列に基づいた系統発生的観点から class 分類されており、その基質特異性に対応する $\beta$ -ラクタム薬の感受性値(MIC)やアシドメトリー法の変法であるPCase/Testにより識別できる。しかし、近年セフファロスポリン系薬の使用量と共に種々の変異型酵素による耐性菌が出現し、ICUや老人病院において院内感染菌として分離されてきており、その迅速識別は治療薬の選択や院内感染防止の観点から重要となる。そこで、当研究課題での分担研究としての目的は、変異型 $\beta$ -ラクタマーゼの遺伝・生化学的解析と検査部でのかかる変異型酵素産生菌の迅速且つ簡便な検出法を確立させることにある。

#### B. 研究方法

平成12年度は、過去2年間に私共が集めた大腸菌および肺炎桿菌の中から経口セフファロスポリン系薬のうちCPDXに対して MIC $\geq$ 2 $\mu$ g/mlを示す85株を選択し、その性状について検討した。その概略は下記の通りである。

先ず、CPDXの耐性をE.coli K12株に接合伝達法

または形質転換法によりそれぞれ伝達した。これら伝達株を各 $\beta$ -ラクタム薬およびclass A型酵素阻害薬 CVA に対する感受性や MIC の違いから分類し、併せて各菌株の酵素活性と基質特異性を PCG, CET, CTX, CAZ および CMZ などを用いて UV 法により求めた。また、class A 型酵素構造遺伝子として TEM, SHV, Toho-1 および Kit-1 (MEN-1) の各プライマーを用いてPCR法により検索した。Class C型酵素については、必要に応じてそのプライマーを用いて調べるか クローニング後その DNA 塩基配列を直接調べた。一方、TEM型と判定された ESBL産生遺伝子をクローニングし、定法通りにその塩基配列を調べた。

#### C. 研究成果

85株について、NCCLS の判定基準法に従って CTX, CAZ および CVA を用いて ESBL 産生菌であることを確認された株で、かつ PCR 法により TEM 産生遺伝子が検出された 21 株を選択した。この 21 株について CPDX 2  $\mu$ g/mlを用いて E.coli K12  $\times$  1037 由来の NA 耐性菌 KU2 に伝達を試み、17株の伝達株を得た。この 17 株について、TEM, SHV, Toho-1 および Kit-1 (MEN-1) のプライマーを用いてそれぞれの産生遺伝子を検出した。その結果、TEM 型 11株、SHV 型 1

株、TEM および Kit-1型 2株、TEM および SHV 型 3株であった。今回は、先ず TEM 型の検出された 11 株について、各種β-ラクタム薬およびβ-ラクタマーゼ阻害剤に対する MIC と酵素の基質特性の違いから 11 株を 5 群に分類した。このうち TEM 型のみが検出された 2 つの群から代表株を各 1 株選び、その塩基配列を決定した。その結果、TEM-10とTEM-15 が同定され、そのDNA塩基配列の相同性から 2 株の TEM 型 ESBLは特定の *Tn* と類似性が高かった。また、本年度に検討した菌株の中から 1 株の class C 型酵素産生プラスミドが検出され、その酵素クローニングにより遺伝子の性状を調べた。この酵素は、典型的な class C型酵素であり、DNA 解析から *C.freundii* と 98% 以上の高い相同性が認められ、かつ *ampC-ampR* を保持していた。また、プラスミド支配の酵素は構成的に産生され、且つその活性も高く、*ampR*かの DNA 塩基配列の一部に既報と異なる部位が確認された。

#### D.考察

本年度の研究結果から、わが国にも少なくとも5つの異なる TEM 型 ESBL 産生菌が存在することが推定された。この点については、残りの ESBL 産生遺伝子だけでなく、TEM そのものについてもその DNA 塩基配列を検討することでわが国において分離される ESBL の出現の背景がより明らかになると期待される。また、この実験過程で既存の ESBLに相当しない新たな ESBL 産生プラスミドも一株と *C.freundii* に由来する class C 型プラス

ミドが検出された。本来 class C 型酵素は、誘導剤存在下でのみ *ampR* が *ampC* を活性化することで酵素活性が増えるとされている。しかし、今回分離したプラスミド性の class C 型酵素産生遺伝子は、*ampR* 変異によることが判った。さらに、このプラスミド保有菌に *E.cloacae* 由来の野生型 *ampR* を共存させるとそのこそ活性は低下が見られた。しかし、*ampC* のプロモーター変異の可能性も否定できないため、今後の課題である。さらに、自然界のセファロスポリン系薬高度耐性菌の中にはかかる *ampR* 変異による耐性菌の存在も考えられる。次年度は、これらの class C 型酵素多量変異株が如何なる変異によるか *ampR* 遺伝子による相補試験により検討する予定である。についても変異部位の特定と変異部位を野生型に戻した場合の酵素活性および耐性発現が如何に変わるかなどについて継続して検討を進める。簡便な耐性菌を検出するための迅速検出法の確立を目指す。

#### E.結論

TEM 型由来の ESBL として TEM-10,TEM-15 が検出され、その違いは各種セファロスポリン系薬に対する MIC やβ-ラクタマーゼ阻害薬などに対する感受性の違いから識別可能であった。また、DNA塩基配列の結果から、ESBL 2 株は由来を同じくする *Tn* に分類された。また、*ampC-ampR* によってコードされた class C 型酵素産生プラスミドが検出され、この遺伝子は DNA 相同性から *C.freundii* 由来と考えら、酵素活性の高い原因は *ampR* 変異により構成的に産生されるこ



とが判った。

研究協力者 岡本了一, 佐藤優子

#### F.研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kuga, A., Okamoto R and Inoue M. *ampR* gene mutations that greatly increase class C  $\beta$ -lactamase in *Enterobacter cloacae*: *Antimicrob Agents Chemother* 44:561-567, 2000
- 2) 久我明男、矢野寿一、岡本了一、佐藤優子、宮田愛子、井上松久. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase 産生菌に対する  $\beta$ -ラクタム系薬の抗菌力の比較 *The Japanese Journal of Antibiotics* 52(9): 585-594, 1999
- 3) Yano, H., A. Kuga, R. Okamoto, H. Kitasato, T. Kobayashi and M. Inoue. A plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (IPM-6) that confer expanded-spectrum carbapenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45(4): in press, 2001
- 4) Matsuoka, M., K. Endo, Y. Nakajima, T. Watanabe and M. Inoue. A new macrolide resistant gene *ermF* that encoded by plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemther* 45(4): in press, 2001

##### 2. 学会発表

- 1) 中野竜一、久我明男、海江田哲、井上松久、岡本了一: 臨床分離の大腸菌から検出された *C. freundii* の Amp C をコードするプラスミドの解析。第49回日本化学療法学会 2000.10 旭川  
(日本化学療法学会雑誌 49: 127, 2001)
- 2) 佐藤優子、中野竜一、保坂美生、井上松久、岡本了一: 大腸菌・肺炎桿菌における TEM 型 ESBL 産生菌の検索。第49回日本化学療法学会 2000.10 旭川 (日本化学療法学会雑誌 49: 128, 2001)

##### G. 知的所有権の取得状況

なし

##### 書籍

Matsuhisa Inoue. Issues and answers in  $\beta$ -lactam resistance. M. Inoue (editor) *Clinical Monograph Series*, Ashmore Press Ltd, Worthing, West Sussex, UK, 2000

## 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

吸器系感染症から分離される肺炎球菌およびインフルエンザ菌における耐性メカニズムの解析とその迅速診断法に関する研究

分担研究者 生方 公子（財）微生物化学研究所

**研究要旨** 呼吸器感染症における起炎菌として重要な肺炎球菌とインフルエンザ菌について、近年増加している耐性菌の耐性メカニズムを遺伝子レベルで解析した。さらにそれらの成績に基づいて耐性に関わる遺伝子領域を特定し、PCRによる遺伝子迅速診断法を確立した。

研究協力者 芝崎有美, 千葉 菜穂子,  
長谷川 恵子  
明治製菓(株)薬品総合研究所  
砂川 慶介  
北里大学医学部感染症学講座

### A. 研究目的

平成10年から平成13年の間に、主に上・下気道感染症、ならびに急性中耳炎例から分離された肺炎球菌とインフルエンザ菌を対象とし、 $\beta$ -ラクタム系薬耐性に関わる遺伝子解析と、マクロライド系薬耐性に関わる遺伝子の解析を行い、その成績に基づいて、耐性に関わる遺伝子領域を特定することを第一の目的とした。

次いで、感性菌と耐性菌を識別するために、PCRを用いた迅速診断法を確立することを第二の目的とした。

第三には、正確な感性と耐性の判定結果が要求される化膿性髄膜炎例から分離された菌について、この迅速診断法が使用可能か否かを検討した。

### B. 研究方法

1) 対象菌株 市中感染症研究会(1998-2000)によって、主に小児の気道感染症と急性中耳炎例から分離され、収集された肺炎球菌とインフルエンザ菌を対象とし、それに加えて、平成12年11月に私達によって発足させた「小児化膿性細菌性髄膜炎全国サーベイランス」研究によって収集された菌株も対象にした。

2) 菌の分離 定法に従って菌の分離を行い、それと平行して私達が構築した肺炎球菌ならびにインフルエンザ菌の感性・耐性を遺伝子レベルで迅速に識別するための「PCR法」を実施し、遺伝子診断結果と通常実施されている薬剤感受性結果との相関性について検証した。感受性測定はNCCLSの基準に従って実施した。

3) 倫理面への配慮 化膿性髄膜炎サーベイランスに関して、各施設から送付されてくる菌株については、症例の倫理面に配慮し、症例の氏名はインシヤルのみ報告してもらい、得られた成績についても検査技師を通じて担当医へ報告はするが、個々の結果については許可なく公表しないこととした。

### C. 研究結果

#### 1. 呼吸器感染症からの肺炎球菌

##### 1) 市中感染症における肺炎球菌の分離状況

検査材料は上咽頭の拭い液が半数以上を占め、次いで鼓膜切開液や耳漏で、咽頭拭い液は10%程度の割合であった。一般的には咽頭拭い液が細菌検査用として採取されているが、常在細菌の混入が多く、起炎菌を特定し難い欠点がある。そのことから、起炎菌の推定確率を高めるために、耳管に近い上咽頭を調べることにした。対象となった症例の半数は診療所関連からの依頼であったが、分離菌の内訳をみると1歳から6歳までの小児において肺炎球菌の分離率が56%と圧倒的に高かった。インフルエンザ菌もこれらの年齢において

37%程度分離されていた。成人例からの検査材料は1割弱で、しかも両菌種の間離は15%程度であった。これら2菌種は、依然として市中呼吸器感染症における主要な起炎菌であることが明らかにされた。

## 2) 肺炎球菌に占める PRSP の割合

ペニシリン G(PCG)やアンピシリン(ABPC)は、本来肺炎球菌に対して0.016 $\mu$ g/ml前後と優れた抗菌力を有していた。現在問題となっている PCG 耐性肺炎球菌(PRSP)は、図1に示すように、基準薬である PCG に対して2 $\mu$ g/ml前後の MIC を示すように変化した菌である。米国の薬剤感受性測定委員会(NCCLS)では、2 $\mu$ g/ml以上を PRSP、0.063 $\mu$ g/ml以下を感敏(PSSP)、0.125~1 $\mu$ g/mlの菌を軽度耐性(PISP)と区別するように勧告しているが、この基準に従うと、本邦において検出される肺炎球菌の45%は既に PRSP であるということになった。PISPも20%近く分離され、PSSPはわずかしかな存在していない結果となった。

## 3) PRSP の耐性メカニズム

このように、本邦において PRSP が急速に増加してきた理由は、広く経口セフェム系薬が使用されていることにあると推定される。

本邦における PRSP も、 $\beta$ -ラクタム系薬の作用標的である細胞壁合成酵素(ムレイン架橋酵素: PBP<sub>s</sub>ともいう)をコードしている遺伝子上に変異の生じた耐性菌であることが私達によって明らかにされている。また、耐性化には細胞壁の伸長化に関わっているとみられる *pbp1a* 遺伝子、菌分裂時の隔壁形成に関わっている *pbp2x* 遺伝子、肺炎球菌特有のランセット型形成に関わっているとみられる *pbp2b* 遺伝子の3つの変異が主に関与している。私達は、これらの *pbp* 遺伝子変異の結果から、図2に示す PCR 法による迅速診断法を確立した。薬剤感受性と遺伝子診断成績の相関を調べると、図1にみられるように、遺伝子が3つとも変異した大多数の菌株が NCCLS の勧告する PRSP に相当し、1~2つの遺伝子に変異した株は PISP であることが明らかにされた。NCCLS の基準では、日本で検出頻度が高い *pbp2x* 変異株は、PCG には0.063 $\mu$ g/mlの MIC を示し、PSSP と判定されていたことが問題点として浮かび上がった。

## 4) PRSP のセフェム系薬感受性

図3には、小児の重症感染症に対して推奨されてきたセフトキサシム(CTX)の成績を示す。この図では、(i)PRSP はペニシリンのみならず、セフェ

ム系薬にも感受性が低下していること、(ii)*pbp2x* 遺伝子変異は PSSP と PRSP のちょうど中間へと MIC がシフトしていること、(iii)CTX に4~8 $\mu$ g/ml といった高い耐性を示す菌が分離され始めていることが注目された。他の注射用セフェム系薬ももちろん同様の成績を示した。

一方、本邦では小児の上気道感染症や急性中耳炎例に対して経口用セフェム系薬が広く使用されているが、欧米ではアンピシリンやアモキシシリン/クラバン酸の倍量投与が推奨されているという違いがみられる。そのためか、欧米で分離される肺炎球菌ではペニシリン系薬に対してさらに耐性度の高い菌株が分離されつつあるのに対し、我が国では *pbp2x* 変異株のように経口セフェム系薬に対する感受性の低下した肺炎球菌が多いことが明らかにされた。

つまり、PRSP とはその特徴を表す薬剤名が付けられた名称に過ぎず、その本質はペニシリン系薬のみならず、セフェム系薬に対する感受性も低下した耐性菌である。

図4に PRSP に対する $\beta$ -ラクタム系薬の抗菌力を比較した累積分布の成績を示す。経口セフェム系薬の中ではセフトレン(CDTR)とセフカペン(CFPN)の抗菌力が優れ、0.5~1 $\mu$ g/ml程度の MIC であった。しかし、これらの経口薬の血液中移行濃度はせいぜい1-2 $\mu$ g/ml程度であることから、臨床的に必要とされる time above MIC は満たしていないことが多いと推定された。PCG と ABPC、セフェム系薬のセフボドキシム(CPD<sub>X</sub>)の MIC は1~2 $\mu$ g/ml、セフジニル(CFDN)のそれは4~8 $\mu$ g/ml、セファクロル(CCL)は32 $\mu$ g/ml以上の MIC とさらに劣っていた。これらの薬剤の血液中移行濃度から判断すると、PRSP が起炎菌の際にはほとんど菌量を減らすことができず、臨床的に無効であろうことが示唆された。

## 5) PRSP のマクロライド系薬感受性

PRSP の多くは $\beta$ -ラクタム系薬のみならず、他の薬剤に対しても耐性化が進行している。そのひとつがマクロライド系薬に対する耐性である。耐性機構のひとつは、細胞質膜上に存在する新たな蛋白の出現で、菌体内に取り込まれた薬剤をアクティブに排出する機構である。もうひとつは、マクロライド系薬の標的であるリボソームをメチル化する機構である。

14 員環マクロライド群と呼ばれるエリスロマイシン(EM)、ロキシスロマイシン(RXM)、クラリスロマイシン(CAM)、アザライド系のアジスロマイシン(AZM)は、この両者の影響を受け耐性化している。前者では MIC が1~8 $\mu$ g/mlと軽度耐

性化、後者では 32 $\mu$ g/ml 以上の高度耐性となる。PRSP の 90%はこれらのマクロライド系薬に対して耐性化していることが明らかにされた。

一方、16 員環マクロライド群に属するジョサマイシン(JM)、ロキタマイシン (RKM)とクリンダマイシン (CLDM)は、薬剤排出機構の影響を受けないことが判った。そのため、70%近い PRSP が依然としてこの系統の薬剤には活性を保持していた(図 5)。

## 2. インフルエンザ菌

### 1) BLNAR の耐性メカニズム

私達は、本邦で急速に増加してきた $\beta$ -ラクタマーゼ非産生 ABPC 耐性インフルエンザ菌(BLNAR と略)の耐性機構について世界で始めて遺伝子解析を行い、耐性に関わる遺伝子を特定した。図 6 にその遺伝子を示すが、菌分裂時の隔壁合成酵素である PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子上に見いだされる変異が主たる耐性機構である。

それらの PBP3 遺伝子変異の成績をもとに、図 7 に示す「BLNAR 耐性遺伝子迅速診断キット」を構築した。

### 3) BLNAR の注射用 $\beta$ -ラクタム系薬感受性

小児重症感染症に対しては ABPC+CTX の併用が推奨されてきたが、PRSP の増加に伴い、本邦ではこの治療法では後遺症を残したり、あるいは救命できない例が急速に増えていることが明らかになってきた。

インフルエンザ菌に対する基準薬の ABPC の抗菌力をみると、図 8 に示すように、PBP3 遺伝子変異のない感性菌の MIC は 0.25 $\mu$ g/ml にピークを認めるが、遺伝子変異の認められた菌では 1 $\mu$ g/ml 以上の MIC を示していた。また、遺伝子変異のレベルには 2 つあり、“軽度耐性 BLNAR”は 1 $\mu$ g/ml の MIC の菌が大半であったが、“BLNAR”では大多数株が $\geq 2\mu$ g/ml 以上の MIC を示した。

特に重要なことは、BLNAR は CTX にも 100 倍近く抗菌力が低下していたことである。のみならず、本邦で使用頻度の高い注射セフェム系薬に対する抗菌力の低下は著しいことが注目された。このような明らかな BLNAR の分離頻度は 1998 年 2.9%、1999 年 6.6%、2000 年 13.7%と指数関数的に増加してきている。後述する化膿性髄膜炎例からも分離され始めている。

### 4) 経口用 $\beta$ -ラクタム系薬

BLNAR に対する主な経口 $\beta$ -lactam 系薬の抗菌力について、その累積分布を図 9 に示す。

“軽度耐性 BLNAR”や“BLNAR”に対する抗菌力は薬剤によって相当異なっていた。

CCL は ABPC 感性インフルエンザ菌に対しては 1~4 $\mu$ g/ml 程度の MIC を示すが、“軽度耐性 BLNAR”や“BLNAR”には 8 $\mu$ g/ml 以上の MIC を示していた。NCCLS では CCL のブレイクポイントを 16 $\mu$ g/ml に設定しているが、CCL の感受性を参考にすれば、BLNAR をかなりの精度で推定できることが示された。

経口薬として使用頻度の高い CPDX、CFDN、CDTR、および CFPN の抗菌力を比較すると、耐性菌に対する挙動はやや異なっていた。

CPDX と CFPN は“軽度耐性 BLNAR”に対する抗菌力はやや低下していたが、CPDX は“BLNAR”に対して 1~16 $\mu$ g/ml、CFPN は 0.5~4 $\mu$ g/ml と抗菌力はさらに低下していた。

一方、CFDN と CDTR は“軽度耐性 BLNAR”に対する抗菌力はやや低下していたが、感性菌の MIC 分布と重なっていたため、明確に識別することができなかった。しかし、“BLNAR”に対してはこれらの薬剤であっても明らかに耐性側にひとつのピークを形成し始めていることが明らかになってきた。

肺炎球菌に抗菌力を有していたベネム系薬の FRPM はインフルエンザ菌に対する抗菌力は劣っていた。

## 3. 化膿性髄膜炎

### 1) 発症年齢と起炎菌との関係

図 10 は、研究協力者の北里大学医学部・砂川慶介教授を班長とする「小児化膿性髄膜炎全国アンケート調査('97年6月~'00年6月)」に対し、全国の小児科医より寄せられた症例情報を元に集計した成績である。症例数は 422 例となっているが、最も頻度の高かった起炎菌はインフルエンザ菌で、次いで肺炎球菌、大腸菌、B 群溶血レンサ球菌の順であった。その他に *N. meningitidis* の 3 例が含まれていた。

インフルエンザ菌性髄膜炎の好発年齢は図 11 に示すように、1 歳から 4 歳にあるのが特徴で、抗体が獲得される 5 歳以下以上ではめったにみられなくなっているのが特徴であった。インフルエンザ菌による感染症は、児が環境に晒された後に発症するものであるが、従来は母体からの抗体が消失する生後 6 ヶ月以降に発症するとされてきた。しかし、集計成績をみると、生後 3 ヶ月と早い時期から発症している乳児のあることが示された。母親からの抗体移行が不十分であったり、生後まもなく保育所へ預けられるといった社会環境の変化が反映されているものと推測された。