

図① M. pneumoniae の気道感染に続発する免疫学的反応の考え方 (筆者作成)

IL-12 の非存在下では Th2 反応を促進させることが *in vitro* の実験で報告されている。IL-18 が Mp 肺炎局所で増加し、病変の広がりや相関することをわれわれは報告した²⁴⁾。IL-12 の低下している症例では IL-18 が Th2 サイトカインを活性化させ喘息様病態になることが推測された。また、IL-18 はマクロファージから IL-8 産生を誘導することが報告されており、IL-8 による炎症と TGF-β1 による線維化の亢進が起こると考えられる³⁾。一方、Mp 膜由来の lipoprotein はラットのマクロファージからの NO 産生を亢進し、IL-18 は Th1 サイトカインとくに IL-2 の産生亢進によりマクロファージを活性化するので、NO-dependent のマクロファージによる Mp 菌の elimination に関与していると考えられる。

2. 治療薬の選択

Mp 肺炎の菌自体に対する治療薬としては、マク

ロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系の薬剤が効果的である。しかし、画像上認められる肺病変の多くが、宿主の免疫反応の反映であるとしたら、本肺炎の治療としては抗菌的立場と免疫過剰状態に対しての二面的な治療を考慮しなければならない。われわれは、マウスのマイコプラズマ肺炎モデルにおいて、菌に対して十分な感受性のあるミノサイクリンの単独治療群、ミノサイクリンとプレドニゾロンの併用治療群、プレドニゾロン単独治療群で比較したところ、ミノサイクリンとプレドニゾロンの併用治療群がミノサイクリン単独治療群よりも肺炎の治癒率が良かった。また、プレドニゾロン単独群では菌が全身に散布してしまったことから、プレドニゾロンの単独治療は危険であり、有効な抗生物質の併用が必須であると考えられた⁹⁾。また、プレドニゾロン併用のタイミングについてのマウスでの検討では、感染3日目から使用した方が、7日目から使用したよりも病変の消失率は良かったことか

ら、免疫抑制剤を投与するには感染初期の方がより有利であることが示唆された。しかし、臨床への応用を考慮すると、病初期に確実な診断が難しいこともあり、呼吸不全を伴う重症例などごく限られた症例に対してのみステロイド短期使用が適応かと思われる。

一方、14員環マクロライド系抗生剤であるクラリスロマイシンには、Mp に対する MIC が 0.0078-0.0156 $\mu\text{g/ml}$ と低くかつ肺への移行性がよい抗菌作用¹⁰⁾を持っているが、ほかにびまん性細気管支炎などの末梢気道病変を改善する抗炎症作用が報告されている⁵⁾。小児のマイコプラズマ肺炎症例で、臨床的にクリンダマイシン耐性と考えられ、クラリスロマイシン単独の治療を開始したところ 2 日間で著明に改善した症例を経験し¹¹⁾、この症例から分離した Mp を遺伝子解析したところ、23S リボゾーム RNA ドメイン V の 2063 番目アデニンがグアニンに置換されたクラリスロマイシン耐性株であった。このことは菌に対する感受性がなかったのにもかかわらず、肺炎が改善したことから、つぎの 2 つのことが推測された。肺炎の自然治癒の時期に一致したか、クラリスロマイシンの抗炎症作用によるものかである。

おわりに

Mp 肺炎の治療には、抗生剤による直接除菌作用と免疫学的作用を利用した抗炎症作用が重要と思われる。14員環マクロライド系薬剤には、その両方を兼ね備えており、Mp 肺炎に有利な治療薬と考えられた。

文 献

- 1) Tanaka H *et al* : Effects of interleukin-2 and cyclosporin A on pathologic features in mycoplasma pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 154 : 1908-1912, 1996
- 2) Narita M *et al* : Close association between pulmonary disease manifestation in *Mycoplasma pneumoniae* infection and enhanced local produc-

tion of interleukin-18 in the lung, independent of gamma interferon. *Clin Diagn Lab Immunol* 7 : 909-914, 2000

- 3) Narita M *et al* : Significant role of interleukin-8 in pathogenesis of pulmonary disease due to *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 8 : 1028-1030, 2001
- 4) Tanaka H, *et al* : Role of interleukin-18 and T-helper type 1 cytokines in the development of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults. *Chest* 121 : 1493-1497, 2002
- 5) 吾妻安良太 : DPB マクロライドの作用機序. THE LUNG-perspective 10 : 179-187, 2002
- 6) 審良静男 : 病原体認識に関わる Toll-like receptor ファミリー. 日本マイコプラズマ学会雑誌 29 : 1-7, 2002
- 7) 田中裕士ほか : マウス *Mycoplasma pulmonis* 肺炎におけるヘルパーT細胞亜集団の肺病理像への影響. 日感染症誌 72 : 342-346, 1998
- 8) Tanaka H *et al* : Relationship between radiological pattern and cell-mediated immune response in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Eur Respir J* 9 : 669-672, 1996
- 9) 田中裕士ほか : マイコプラズマ肺炎における prednisolone の投与意義—マウス感染モデルを用いて—。日胸疾会誌 32 : 42-47, 1994
- 10) Izumikawa K, *et al* : In vitro activities of quinupristin-dalfopristin and the streptogramin PRP 106972 against *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 42 : 698-699, 1998
- 11) 成田光生ほか : 肺炎マイコプラズマ感染症における臨床的クリンダマイシン耐性について. 臨床小児医学 48 : 123-127, 2001

田中裕士 : TANAKA Hiroshi

1957年7月28日、北海道小樽市生まれ

専門 : アレルギー喘息, 環境医学, 呼吸器感染症

研究テーマ : 気管支喘息の病態解明と治療, きの子胞子のアレルギー機序の解明, マイコプラズマ感染症

趣味 : 旅行, 登山, 合唱



M. pneumoniae による呼吸器疾患の発症とサイトカイン—特に IL-18の寄与—

田中 裕士、成田 光生、千葉 弘文、阿部 庄作

札幌医科大学医学部第三内科、札幌鉄道病院小児科
〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目 札幌医大医学部第三内科
電話番号 011-611-2111 (内線3239)
E-mail tanakah@sapmed.ac.jp

キーワード：細胞性免疫、自然免疫、インターロイキン18

要 旨

Mycoplasma pneumoniae (Mp) 感染が引き起こす免疫反応系として、マクロファージなどの貪食細胞上の toll-like receptor (TLR)-2および TLR-6が Mp 膜由来の lipoprotein を認識し、この受容体を介して自然免疫、獲得免疫が活性化される系が考えられる。Mp 肺炎の気管支肺動脈周囲間質の病変は、Th 1 サイトカイン刺激で増大し、Th 1 反応抑制剤で減弱する。IL-18は当初 IFN γ 誘導因子として発見されたが、IL-12の存在下では Th 1 反応を促進させ、IL-12の非存在下では Th 2 反応を促進させることが in vitro で報告されている。IL-18が Mp 肺炎局所で増加し、病変の広がりや相関することをわれわれは報告した。IL-12の低下している症例では IL-18が Th 2 サイトカインを活性化させ喘息様病態になることが推測される。また、IL-18はマクロファージから IL-8産生を誘導することが報告されており、IL-8による炎症と TGF β 1による線維化の亢進が起これと考えられる。IL-18は IL-2の産生亢進によりマクロファージを活性化するので、NO-dependent の Mp 菌の elimination にも関与していると考えられる。

序 文

Mycoplasma pneumoniae (Mp) 肺炎では、感染が引き金となった種々の免疫反応の亢進が起こることが言われてきた。最近の研究結果から成人の肺病変の病態形成にも、種々のサイトカインの関与が明らかになりつつあり¹⁻⁴⁾、肺病変自体が宿主の免疫反応の反映を見ているのではないかという機序も考えられる。Interleukin-18 (IL-18) は当初 interferon- γ (IFN- γ) 誘導因子として発見され Th 1 反応を亢進させるものと思われたが、その後の検討で IL-12の存在下では Th 1 反応を促進させ、IL-12の非存在下では Th 2 反応を促進させる特殊なサイトカインとして認識されている。IL-18が Mp 肺炎局所で増加し、病変の広がりや相関することをわれわれは報告したが、本稿では Mp 肺炎の発症機序における最近の考え方とその過程における IL-18の寄与について述べたい。

マイコプラズマ肺炎の発症機序

Mp の感染は、飛沫が口や鼻から気道に入り、Mp が気道上皮細胞の線毛間に attachment し増殖する。Mp には菌による直接作用と間接作用がある。直接作用としては菌の増殖の過程で産生される活性酸素による細胞障害があるが、間接的障害は菌体成分が宿主の免疫反応を惹起し細胞傷害作用を起こす。Mp 呼吸器感染症は、さまざまな免疫学的な合併症を引き起こし、最近では T ヘルパー 2 疾患である

喘息との関連も示唆されている (表 1)。Mp 感染が引き起こす免疫反応は、最近の知見ではマクロファージなどの貪食細胞上の toll-like receptor (TLR)-2および TLR-6が Mp 膜由来の lipoprotein を認識し、この受容体を介する自然免疫反応がそれに引き続く獲得免疫反応の成立を支配していると考えられている (図 1)。また、肺サーファクタントの構成成分である surfactant protein-A (SP-A) や SP-D

表 1 マイコプラズマ感染と気管支喘息

Yano T, et al. Am J Respir Crit Care Med 149: 1348-1353, 1995 M. pneumoniae 感染による喘息発症症例の報告、感染 2 年後にも気道過敏性亢進があり、M. pneumoniae に対する特異的 IgE の証明、菌体抗原に対する即時型皮内反応陽性
Martin RJ et al. J Allergy Clin Immunol 107: 595-601, 2001 喘息患者 55 名中 25 名に M. pneumoniae、6 名に C. pneumoniae が、気管支肺胞洗浄液、気管支生検から PCR 法または培養で陽性
Kraft M, et al. Chest 121: 1782-1788, 2002 PCR で M. pneumoniae または C. pneumoniae 陽性の気管支喘息では、対照と比較して CAM 6 週間投与により有意に一秒量が改善した。
Chu HW, et al. Infect Immunity 71: 1520-1526, 2003 マウスの M. pneumoniae 感染で感作前に感染させると IFN- γ /IL-4 の比の上昇、感作後に感染させると IL-4 が上昇

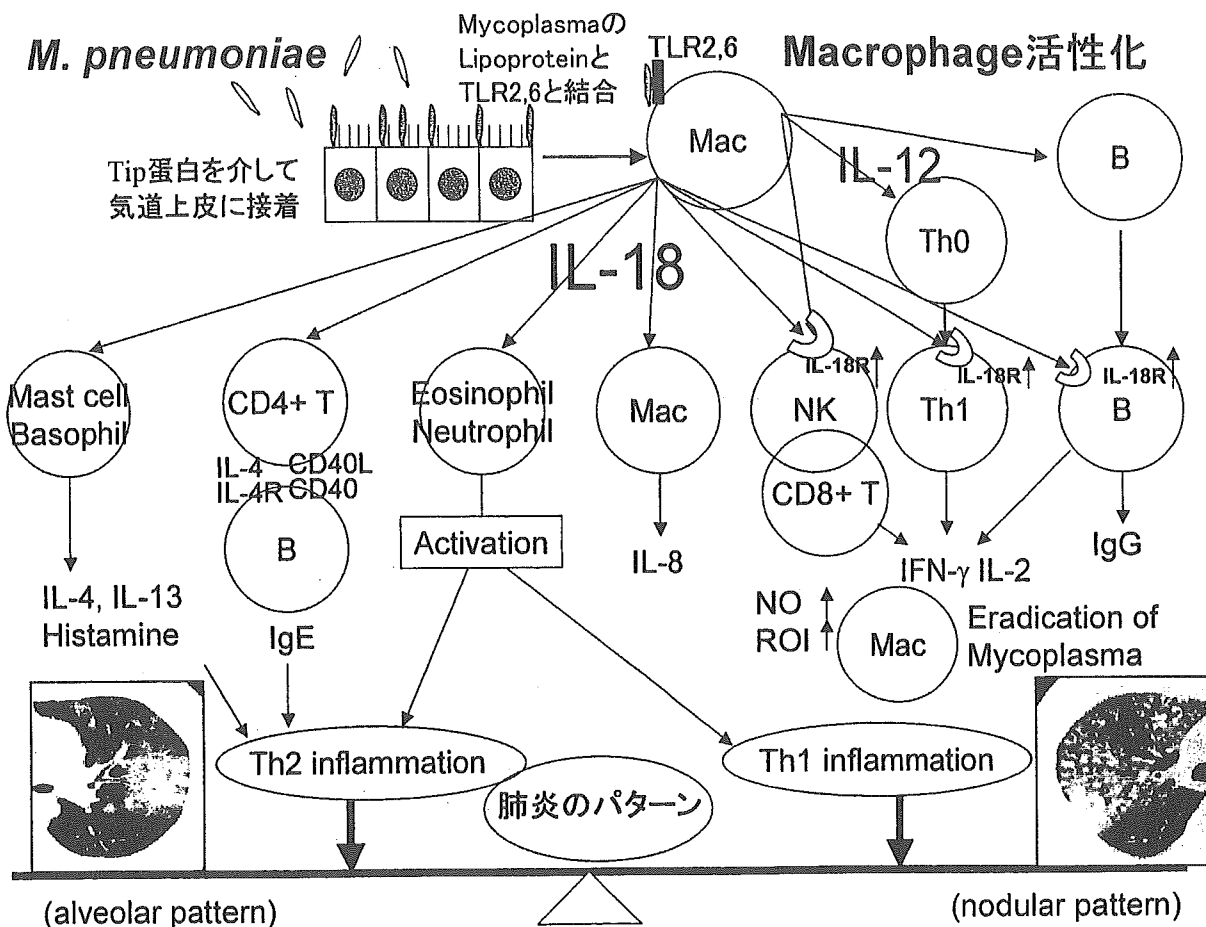


図1 *M.pneumoniae* の気道感染に続発する免疫学的反応の模式図 (推測)

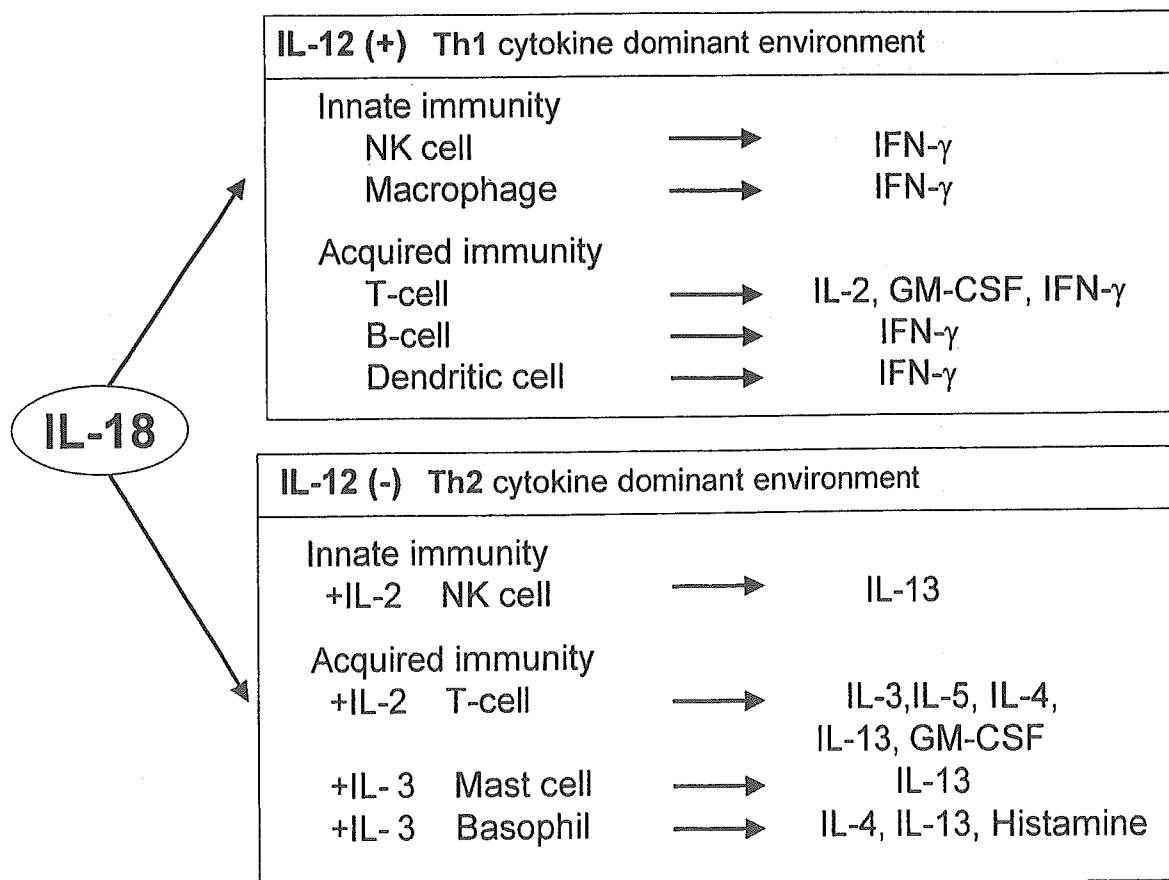


図2 IL-18の作用機序. IL-12存在下ではTh1サイトカインを亢進させ、IL-12非存在下ではTh2サイトカインを亢進させる。

蛋白には、種々の細菌に対する自然免疫を調節する作用があることが知られている。SP-A には、Mp 菌の脂質と強く結合することによって直接菌の増殖を抑制する作用が報告され、Mp 菌感染防御の自然免疫に関与している^{6,7)}。

Mp 肺炎の胸部レントゲン所見はさまざまな陰影のパターンを呈するが、これは宿主の細胞性免疫反応の差を反映しているものではないかと考えている。CT 像を用いたわれわれの解析では、気管支肺動脈周囲間質病変（気管支壁の肥厚像）が本肺炎の75%の症例に認められ、肺野陰影のない部位でも認められることが特徴である。気管支肺動脈周囲間質の病変は、免疫反応の場として重要であり、マウスモデルでの実験では interleukin-2 (IL-2) の投与でこの病変は亢進し、細気管支領域にはマクロファージの集積による粒状陰影が増加した¹⁾。一方、cyclosporin A (CYA) の投与ではこの病変は抑制され、好中球を主体とした肺炎が主体であった¹⁾。Th 1 反応優位マウス (C57B/6) の感染では IL-2 投与と同様な病変パターンで、Th 2 反応優位マウス (Balb/c) の感染では CYA 投与と同様な病変となった⁹⁾。Mp 肺炎初期には約 6 割の症例でツベルクリン反応が陰性化するが、われわれの検討では Mp 肺炎患者のツベルクリン皮内反応が陰性の症例では浸潤陰影が優位で、ツベルクリン皮内反応が陽性の症例では粒状陰影が優位となった⁹⁾。以上から、Mp 肺炎の病変形成には Th 1 および Th 2 が強く関与し、そのバランスの調節している因子が重要であることが示された。

IL-18の寄与

IL-18は当初、IFN γ 誘導因子として発見されたが、IL-12の存在下では Th 1 反応を促進させ、IL-12の非存在下では Th 2 反応を促進させることが *in vitro* の実験で報告されている（図2）。われわれは IL-18が Mp 肺炎局所で増加し、病変の広がりと同関することを報告した^{2,4)}。さらに血中 IL-18値は、感染回復後もしばらくたっても高値を維持していた。Mp 肺炎回復後も小葉中心性の粒状陰影が持続したり、喘息様状態が継続することをしばしば経験する。IL-12が高値の人では、気管支肺動脈周囲間質から細気管支炎が残存し、画像で粒状陰影を呈したり、間質性変化を残すことが考えられる。また IL-12の低下している症例では IL-18が Th 2 サイトカインを活性化させ喘息様病態になることが推測された。

一方、IL-18はマクロファージから IL-8 産生を誘導することが報告されており、IL-8 による炎症と TGF β 1 による線維化の亢進が起こると考えられる⁹⁾。一方、Mp 膜由来の lipoprotein はラットのマクロファージからの NO 産生を亢進し、IL-18は Th 1 サイトカイン特に IL-2 の産生亢進によりマクロファージを活性化するので、NO-dependent のマクロファージによる Mp 菌の elimination に関与していると考えられる。

治療

Mp 肺炎の菌自体に対する治療薬としては、マクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系、ケトライド系の薬剤が効果的である。しかし、画像上認められる肺病変の多くが、宿主の免疫反応の反映であるとしたら、本肺炎の治療としては抗菌的立場と免疫過剰状態に対しての二面的な治療を考慮しなければならない。われわれは、マウスのマイコプラズマ肺炎モデルにおいて、菌に対して十分な感受性のあるミノサイクリンの単独治療群、ミノサイクリンとプレドニンの併用治療群、プレドニン単独治療群で比較したところ、ミノサイクリンとプレドニンの併用治療群がミノサイクリン単独治療群よりも肺炎の治療率が良かった。また、プレドニン単独群では菌が全身に散布してしまったことから、プレドニンの単独治療は危険であり、有効な抗生物質の併用が必須であると考えられた¹⁰⁾。また、プレドニン併用のタイミングについてのマウスでの検討では、感染3日目から使用した方が、7日目から使用したよりも病変の消失率は良かったことから、免疫抑制剤を投与するには感染初期の方がより有利であることが示唆された。しかし、臨床への応用を考慮すると、病初期に確実な診断が難しいこともあり、呼吸不全を伴う重症例などごく限られた症例に対してのみステロイド短期使用が適応かと思われる。

引用文献

- 1) Tanaka, H., Honma, S., Abe, S., and Tamura, H. Effects of interleukin-2 and cyclosporin A on pathologic features in mycoplasma pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**: 1908-1912, 1996.
- 2) Narita, M., Tanaka, H., Abe, S., Yamada, S., Kubota, M., and Togashi, T. Close association between pulmonary disease manifestation in *Mycoplasma pneumoniae* infection and enhanced local production of interleukin-18 in the lung, independent of gamma interferon. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**: 909-914, 2000.
- 3) Narita, M., Tanaka, H., Yamada, S., Abe, S., Ariga, T., and Sakiyama, Y. Significant role of interleukin-8 in pathogenesis of pulmonary disease due to *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 1028-1030, 2001.
- 4) Tanaka, H., Narita, M., Teramoto, S., Saikai, T., Oashi, K., Igarashi, T., and Abe, S. Role of interleukin-18 and T-helper type 1 cytokines in the development of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults. *Chest* **121**: 1493-1497, 2002.
- 5) 審良静男：病原体認識に関わる Toll-like receptor ファミリー。日本マイコプラズマ学会雑誌 **29**: 1-7, 2002.
- 6) Chiba, H., Pattanajitvilai, S., Evans, A.J., Harbeck, R.J., and Voelker, D.R. Human surfactant protein D (SP-D) binds

- Mycoplasma pneumoniae* by high affinity interactions with lipids. *J. Biol. Chem.* 277: 20379-85, 2002.
- 7) Chiba, H., Pattanajitvilai, S., Mitsuzawa, H., Kuroki, Y., Evans, A., and Voelker, D.R. Pulmonary surfactant proteins A and D recognize lipid ligands on *Mycoplasma pneumoniae* and markedly augment the innate immune response to the organism. *Chest* 123: 426S, 2003.
- 8) 田中裕士、阿部庄作、田村 弘. マウス *Mycoplasma pulmonis* 肺炎におけるヘルパー T細胞亜集団の肺病理像への影響. *日感染症誌*72: 342-346, 1998.
- 9) Tanaka, H., Koba, H., Honma, S., Sugaya, F., and Abe, S. Relationship between radiological pattern and cell-mediated immune response in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Eur Respir J* 9: 669-672, 1996.
- 10) 田中裕士、岡田春夫、山岸雅彦、本間伸、菅原洋行、阿部庄作、田村 弘. マイコプラズマ肺炎における prednisolone の投与意義—マウス感染モデルを用いて—. *日胸疾会誌*32: 42-47, 1994.

Cytokine and *M. pneumoniae* pneumonia; Contribution of interleukin-18

Hiroshi Tanaka¹, Mitsuo Narita², Hirofumi Chiba¹, Shosaku Abe¹

¹Third Dept. of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine,
South-1, West-16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan

Tel: 011-611-2111 (ext. 3239) E-mail: tanakah@sapmed.ac.jp

²Department of Pediatrics, Sapporo Tetsudo (JR) Hospital, Sapporo

N3, E 1, Chuo-ku, Sapporo 060-0033, Japan

Tel: 011-241-4971 E-mail: naritamy@d5.dion.ne.jp

Key words : cell mediated immunity, innate immunity, IL-18,

Immunological inflammation due to *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) infection is initially induced by recognition of lipoproteins existing in the surface of Mp organism through toll-like receptor 2 and 6 on the membrane of antigen presenting cells. These reactions may regulate innate immune reactions following acquired immune reactions, which develop pulmonary lesions. Peribronchial and periarterial lymphocyte cuffing in the lung was increased by T-helper 1 cytokine, and reduced by T-helper 1 inhibitor in mice. Interleukin-18 was discovered as an interferon- γ inducing factor, but it acts as activator of T-helper 1 immunoreactions when IL-12 exists, on the contrary it acts as activator of T-helper 2 immunoreactions when IL-12 is absent in vitro. We have reported that IL-18 was increased in the lesion of Mp pneumonia, and the IL-18 levels were correlated with the degree of pneumonia. It is speculated that in case of decreased IL-12, Mp infection may activate T-helper 2 cytokines, consequently developing asthma-like symptoms. IL-18 also induces IL-8 production from macrophages, which may stimulate inflammation by IL-8 and fibrotic process by TGF β 1. As IL-18 up-regulates IL-2 production, IL-18 may activate macrophages and contribute to NO-dependent elimination of Mp organism.

マクロライド耐性 *M. pneumoniae* による肺炎の臨床と分離株の性状

成田 光生

札幌鉄道病院 小児科

060-0033 札幌市中央区北3条東1丁目 TEL; 011-241-4971

naritamy@d5.dion.ne.jp

キーワード: 臨床分離株、point mutation、23S リボソーム RNA.

【要 旨】

平成12年札幌において臨床的に CAM が奏効した患者から分離したマイコプラズマは CAM に対しても耐性で、23SrRNA ドメイン V における A2063G という遺伝子変異を有していた。平成14年北海道の池田町において AZM が奏効した症例から得られた1株は14から16員環全てのマクロライドに耐性で A2063C の変異が認められた。さらに札幌において AZM が奏効した患者から耐性株 (A2063G) が分離された。マイコプラズマ肺炎における14、15員環マクロライドの治療効果は抗菌作用だけではなく、免疫修飾作用も重要な役割を演じていることが推測された。

【序 文】

演者らは平成12年秋から14年冬にかけて、札幌市及び北海道の池田町において、薬剤耐性マイコプラズマ野生株を分離した。本稿では耐性株感染症例の臨床経過を中心に述べる。

【症 例】

症例1は9歳女児、平成12年11月25日から39度台の発熱が出現し11月28日近医を受診、左の肺炎と診断された。7日間連日、クラリダマイシン (CLDM) の点滴静注を受けたが改善せず、12月5日には右上葉にも無気肺像が出現、札幌鉄道病院に入院となった。CLDM 耐性マイコプラズマ肺炎と考え、クラリスロマイシン (CAM) 単剤にて治療を開始、2日間で解熱し、X線写真上の陰影も速やかに改善した。北海道の池田町では平成14年5月中旬から11月中旬まで約50例のマイコプラズマ肺炎あるいは気管支炎などの発生をみた。このうち、実際に株を分離し得た1例(症例2)を紹介する。本例は13歳女児で、8月23日から発熱、CAMの投与を受けるも発熱が続き26日池田町立病院を受診、左上肺野に肺炎像を認めた。弟が10日前までマイコプラズマ肺炎にて隣町の帯広協会病院に入院、その経過がCAMに抵抗性だったことから、CAM耐性と考えられた。まずアジスロマイシン (AZM) に変更され、さらにミノサイクリンが投与され、その後解熱し、肺炎像も消失した。経過全体を見ると、本例ではミノサイクリンよりはAZMが奏効していたと考えられる。さらに平成14年札幌で、耐性菌が分離された。これも演者自身が診た例で、初期治療のセフェム剤が効かず、AZMが奏効したという臨床経過から全くノーマークであったが、分離株はAZMに耐性で

あった。これを症例3とする。なお前述の池田町では11月に、初期治療のAZMにより2日以内に解熱していた患者からマクロライドに対して不完全な耐性株も分離されており、これを症例4とする。

【方 法】

マイコプラズマは自家製の PPLO 培地を用いて分離した。神奈川県衛生研究所に分離株を送付し、薬剤感受性試験を行なった。さらに国立感染症研究所にて23S リボソーム RNA ドメイン V の遺伝子配列の決定を行なった。

【結 果】

結果を表にまとめた。それぞれの分離株は、臨床的に明らかに奏効した薬剤に対しても耐性であった。

表 薬剤耐性マイコプラズマ株が分離された症例の概要とその分離株の性状。

症 例 (地区)	年齢・性別	初期治療 (発熱持続日数)	奏効薬剤(解熱日数)と その MIC ($\mu\text{g/ml}$)	遺伝子 変異*
1(札幌)**	9歳・女	CLDM(7)	CAM(<2); >12.5	A2063G
2(池田)	13歳・女	CAM(2)	AZM(<3); >12.5	A2063C
3(札幌)	2歳・女	CDTR-PI(4)	AZM(<1); >12.5	A2063G
4(池田)	7歳・女	無し	AZM(<2); >12.5	C2617G

*; 肺炎マイコプラズマにおける23SrRNA ドメイン V の塩基部位。2063番は大腸菌では2058番の A に相当。

**.; 文献(8)にて報告済み。

【考 察】

マイコプラズマ肺炎の病態が宿主の免疫応答により形成されることは一般に認められている。この点に関し演者ら

及び札幌医大・第3内科・田中裕士らのグループはこれまでに、マイコプラズマ肺炎の病変形成においてはマクロファージが起点となり、一方でTh1型サイトカインの亢進により炎症が惹起され、もう一方ではIL-18を介してのIL-8産生が重要な役割を演じている可能性を報告した(5, 6, 11, 12)。この点、14, 15員環マクロライドは、気管支上皮細胞あるいはマクロファージなどからのこれらTh1型サイトカインあるいはIL-8産生抑制作用を有することが報告されている(1-4, 7, 9, 10)。そこでマイコプラズマ肺炎に対する14, 15員環マクロライドの治療効果には、抗生剤としての抗菌作用に加えてその免疫修飾作用が重要な役割を演じているとすれば、耐性菌感染においても臨床的にはマクロライド剤の治療効果が認められた現象を説明できるのではないかと考えられる。

【研究協力】

原田正平(池田町立病院)、岡崎則男(神奈川衛研)、佐々木次雄(国立感染症研)、山田諭(とんでん小児科)。

【引用文献】

1. Fujii, T., J. Kadota, T. Morikawa, et al: Inhibitory effect of erythromycin on interleukin 8 production by 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃-stimulated THP-1 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1548-1551, 1996.
2. Hardy, R. D., A. M. Rios, S. Chavez-Bueno, et al: Antimicrobial and immunologic activities of clarithromycin in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae*-induced pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1614-1620, 2003.
3. Khair, O. A., J. L. Devalia, M. M. Abdelaziz, et al: Effect of erythromycin on *Haemophilus influenzae* endotoxin-induced release of IL-6, IL-8 and sICAM-1 by cultured human bronchial epithelial cells. *Eur. Respir. J.* 8: 1451-1457, 1995.
4. Labro, M. T. Anti-inflammatory activity of macrolides: a new therapeutic potential? *J. Antimicrob. Chemother.* 41 (Suppl. B): 37-46, 1998.
5. Narita M., H. Tanaka, S. Abe, et al: Close association between pulmonary disease manifestation in *Mycoplasma pneumoniae* infection and enhanced local production of interleukin-18 in the lung, independent of gamma interferon. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7: 909-914, 2000.
6. Narita M., H. Tanaka, S. Yamada, et al: Significant role of Interleukin-8 in pathogenesis of pulmonary disease due to *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 1028-1030, 2001.
7. Oishi, K., F. Sonoda, S. Kobayashi, et al: Role of Interleukin-8 (IL-8) and an inhibitory effect of erythromycin on IL-8 release in the airways of patients with chronic airway diseases. *Infect. Immun.* 62: 4145-4152, 1994.
8. Okazaki, N., M. Narita, S. Yamada, et al: Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* 45: 617-620, 2001.
9. Sakito, O., J. Kadota, S. Kohno, et al: Interleukin 1β , tumor necrosis factor alpha, and Interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration* 63: 42-48, 1996.
10. Takizawa, H., M. Desaki, T. Ohtoshi, et al: Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 266-271, 1997.
11. Tanaka, H., S. Honma, S. Abe, et al: Effects of interleukin-2 and cyclosporin A on pathologic features in *Mycoplasma pneumoniae*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 1908-1912, 1996.
12. Tanaka, H., M. Narita, S. Teramoto, et al: Role of Interleukin-18 and T-helper type 1 cytokines in the development of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in adults. *Chest* 121: 1493-1497, 2002.

Macrolide-resistance in patients with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia.

Mitsuo NARITA

Department of Pediatrics, Sapporo Tetsudo Hospital.
N 3 E 1, Chuo-ku, Sapporo 060-0033, Japan.

Keywords : antibiotic susceptibility, mutation, 23S rRNA.

Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* has seldom been isolated from patients, and the clinical manifestations of infection with resistant strains are unknown. We report here four cases of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia successfully treated with macrolide therapy, despite macrolide resistance of their isolates. Minimal inhibitory concentrations were determined by a micro dilution method based on NCCLS and 23S rRNA gene sequences were determined by direct sequencing of PCR products. We identified in three isolates a point mutation in domain V of the 23S rRNA gene (A2063G in two isolates and A2063C in one; A2063 is equivalent to A2058 in *Escherichia coli*). In addition to direct antimicrobial activity against *Mycoplasma pneumoniae*, immunomodulatory effects are strongly suggested to play a role in the clinical efficacy of macrolides against *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia.

マクロライド耐性肺炎マイコプラズマの分離と耐性株の遺伝子変異

岡崎 則男¹、大屋日登美¹、佐々木次雄²、成田 光生³

¹神奈川県衛生研究所微生物部

〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1、Tel: 0467-83-4400、E-mail: okazaki.i73r@pref.kanagawa.jp

²国立感染症研究所細菌第2部

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1、Tel: 0425-61-0771、E-mail: sasaki@nih.go.jp

³札幌鉄道病院小児科

〒060-0033 札幌市中央区北3条東1丁目、Tel: 011-241-4971、E-mail: naritamya@d5.dion.ne.jp

【要 旨】

2001年～2003年に分離された肺炎マイコプラズマ14株を供試し、マクロライド系抗生物質8剤、リンコマイシンおよびテトラサイクリン系抗生物質各2剤に対する感受性を調べた。その結果、3株(21.4%)が供試したマクロライド系抗生物質の全てあるいは一部に耐性であった。これらの耐性株の内、2株は23S rRNA 遺伝子の2063位のアデニンがシトシン(A2063C)またはグアニン(A2063G)に置換していた。A2063C株は供試した全てのマクロライド系抗生物質に高度の耐性を示し、A2063G株は16員環抗生物質に対する耐性が比較的低かった。しかし、他の1株はこれらの位置には変異は見られず、14員環抗生物質に中等度の耐性を示したものの、16員環抗生物質には感受性であった。このように、患者から分離された抗生物質耐性肺炎マイコプラズマはマクロライド交差耐性あるいは遺伝子変異において一様ではなかった。

【はじめに】

1990年代に入り、肺炎マイコプラズマ感染症流行の4年周期性が崩れ、患者も減少傾向を示している¹⁾。その一方で、2000年以降、臨床分離株の中にマクロライド耐性株が検出され始めた²⁾。国内においては2000～2003年にかけて北海道および高知県において計6株の耐性株が分離されている。著者らは、北海道で分離された3株のマクロライド耐性肺炎マイコプラズマの各種抗生物質に対する交差耐性および遺伝子変異を調べたので報告する。

【材料と方法】

2001～2003年にかけて、札幌鉄道病院小児科において分離された14株の肺炎マイコプラズマを供試し、微量液体希釈法^{3,4)}により抗生物質感受性試験を実施した。抗生物質は、erythromycin (EM)、oleandomycin (OM)、josamycin (JM)、spiramycin (SPM)、midecamycin (MDM)、clarithromycin (CAM)、roxithromycin (RXM)、azithromycin (AZM)、lincomycin (LCM)、tetracycline (TC) および minocycline (MINO) の計11剤を使用した。また、マクロライド耐性と判明した肺炎マイコプラズマ分離株の23S rRNA 遺伝子ドメイン V 領域における塩基配列を解析した⁵⁾。

【結果と考察】

2001～2003年にかけて札幌鉄道病院で分離された14株の肺炎マイコプラズマの内、3株(21.4%)がマクロライド系抗生物質に対して耐性であった。テトラサイクリン系に

は感受性であった。これらの3株の耐性株の各抗生物質に対する MIC ($\mu\text{g/ml}$) および23S rRNA 遺伝子変異を Table 1 に、11株の感受性株の MIC を Table 2 に示した。Table 1 のように、3株の耐性株の内、2株(N-2、N-12)は今回供試したマクロライド系および類似抗生物質の全てに耐性を示した。しかし、これら2株は23S rRNA 遺伝子の異なる位置に変異を起こしており、N-2はA2063C、N-12はA2063Gの点変異が検出された。Table 2の感受性株と比べて明らかのように、A2063C株は供試した全てのマクロライド系抗生物質に高度の耐性を示し、A2063G株はJM、SPM およびMDM等の16員環抗生物質に対する耐性が比較的低かった。肺炎マイコプラズマにおいてA2063Cの変異を検出したのは著者らが最初である。これらの2株の耐性株と異なり、23S rRNA 遺伝子に変異が検出されなかった1株(N-11)は、EM、OM、CAM およびRXM等の14員環抗生物質に中等度の耐性を示したものの、16員環抗生物質には感受性であった。

著者らは、試験管内でEMにより選択された耐性肺炎マイコプラズマが23S rRNA 遺伝子においてA2063G、A2064CあるいはA2064Gの変異を起こしており、同時に変異が認められない耐性菌も存在したことを報告した⁶⁾。今回のように、臨床分離株でも2063および2064位に変異の無い耐性菌が見つかったことから、マクロライド耐性肺炎マイコプラズマがこれら以外の位置あるいは23S rRNA 遺伝子以外に変異を有する可能性があると考えられる。

国内においては患者からの肺炎マイコプラズマ分離を試

Table 1. MICs for three isolates of macrolide-resistant *M. pneumoniae* with or without 23S rRNA mutation.

Strains	Mutation	MICs ($\mu\text{g/ml}$)										
		EM	OM	JM	SPM	MDM	Antibiotics					
							CAM	RXM	AZM	LCM	TC	MINO
N-2	A2063C	>200	>200	50-	50-	50-	100-	>200	6.25-	100-	0.39-	0.098-
				100	100	100	200					
N-12	A2063G	>200	>200	3.12-	3.12-	3.12-	>200	>200	12.5-	50-	0.39-	0.19-
				6.25	6.25	6.25	25					
N-11	no mutation	3.12-	25-	0.19	0.39-	0.39-	3.12	6.25-	0.012-	6.25-	0.39-	0.19-
		6.25	50	0.39	0.78	0.78	6.25					

Table 2. MICs for eleven isolates of macrolide-sensitive *M. pneumoniae*.

Antibiotics	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	Antibiotics	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)
EM	0.003-0.012	RXM	0.003-0.006
OM	0.049-0.195	AZM	0.000012-0.00048
JM	0.006-0.049	LCM	3.125-12.5
SPM	0.024-0.195	TC	0.195-0.78
MDM	0.012-0.049	MINO	0.098-0.195
CAM	0.00038-0.0015		

みている機関が少ないため、耐性菌の浸淫状況の実態は現在不明である。しかし、著者らが1998年までの肺炎マイコプラズマ分離株296株につき抗生物質感受性試験を実施したところ、マクロライド耐性株は存在しなかった(未発表)ことから、今回の結果は、最近国内において耐性肺炎マイコプラズマが急激に増加していることを示すものと思われる。マクロライド系抗生物質は肺炎マイコプラズマ感染症治療の第一選択薬剤として使用されており、耐性菌の出現は大きな問題と言える。今後、耐性菌に関して、その疫学的実態、耐性機構、治療効果を有する薬剤の模索等、様々な面からの検討が必要と思われる。

【文 献】

1. 原 耕平: 肺炎マイコプラズマ感染症における諸問題. 日本マイコプラズマ学会雑誌, 22: 86-89, 1995.
2. Ishida, K., M. Kaku, K. Irifune, R. Mizukane, H. Takemura, R. Yoshida, H. Tanaka, T. Usui, N. Suyama, K. Tomono, H. Koga, S. Kohno, K. Izumikawa, and K. Hara: In vitro and in vivo activities of macrolides against *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 790-798,

1994.

3. Lucier, T., K. Heitzman, S.-K. Liu, and P.-C. Hu: Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2770-2773, 1995.
4. Ludwig, W., G. Kirchof, N. Klugbauer, M. Weizenegger, D. Betzl, M. Ehrmann, C. Hertel, S. Jilg, R. Tatzel, H. Zitzelsberger, S. Liebl, M. Hochberger, J. Shah, D. Lane, and P. R. Wallnoef: Complete 23S ribosomal RNA sequences of Gram-positive bacteria with a low DNA G + C content. Syst. Appl. Microbiol. 15: 487-501, 1992.
5. 岡崎則男, 明間鯉一郎, 広岡義郎, 滝沢金次郎: *Mycoplasma pneumoniae* の抗生物質感受性について. 神奈川県衛研報告. 17: 8-13, 1987.
6. Okazaki, N., M. Narita, S. Yamada, K. Izumikawa, M. Umetu, T. Kenri, Y. Sasaki, Y. Arakawa, and T. Sasaki: Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. Microbiol. Immunol. 45, 617-620, 2001.

Inactivation of Macrolides by Producers and Pathogens

Mayumi Matsuoka* and Tsuguo Sasaki

Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan

Abstract: Inactivation, one of the mechanisms of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin (MLS) antibiotics, appears to be fairly rare in clinical isolates in comparison with target site modification or efflux. However, inactivation is one of the major mechanisms through which macrolide-producing organisms avoid self-damage during antibiotic biosynthesis.

The inactivation mechanisms for MLS antibiotics in pathogens are mainly hydrolysis, phosphorylation, glycosylation, reduction, deacylation, nucleotidylation, and acetylation. The *ere* (erythromycin resistance esterase) and *mph* (macrolide phosphotransferase) genes were originally found in *Escherichia coli*. Subsequently, Wondrack *et al.* (Wondrack, L.; Massa, M.; Yang, B.V.; Sutcliffe, J. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, *40*, 992) reported *ere*-like activity in *Staphylococcus aureus*. In addition, a variant of erythromycin esterase was found in *Pseudomonas* sp. from aquaculture sediment by Kim *et al.* (Kim, Y.H.; Cha, C.J.; Cerniglia, C.E. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2002**, *210*, 239). Although the *mph* genes, including *mph*(K), were first characterized in *E. coli*, a recent study revealed that *S. aureus* and *Stenotrophomonas maltophilia* have *mph*(C). The *mph*(C) has a low G+C content, like *mph*(B), and has high homology with *mph*(B), but not with *mph*(A) or *mph*(K). Consequently, the *mph*(C) and *ere*(B) genes seem to have originated from Gram-positive bacteria and been transferred between Gram-positive and Gram-negative bacteria.

In this chapter, the genes and the mechanisms involved in the inactivation of MLS antibiotics by antibiotic-producing bacteria are reviewed.

Key Words: Macrolide antibiotics, macrolide resistance, inactivation, erythromycin esterase, phosphotransferase, glycosyltransferase, acetylation, hydrolysis.

(A) PRODUCERS

Most macrolides are produced by *Streptomyces* species, and inevitably the biosynthesis of a potentially lethal antibiotic in these microorganisms requires self-defence mechanisms to avoid suicide. To date, three distinct self-defence mechanisms have been reported in macrolide-producing organisms. The first mechanism is modification of the ribosome (the antibiotic target site) by monomethylation or dimethylation of a single adenine residue in the 23S rRNA gene; this results in resistance to erythromycin [1], tylosin [2, 3] and carbomycin [4]. The second mechanism is active efflux. Some macrolide producers have ABC (ATP-binding cassette) transporters that pump out macrolides through ATP-dependent pathways, thereby providing resistance to these macrolides [5-8]. The third is the existence of antibiotic-modifying enzymes. *Streptomyces antibioticus*, an oleandomycin (OL) producer, possesses a glycosyltransferase that inactivates OL by glycosylation of a hydroxyl group of the sugar desosamine attached to the aglycone [9, 10]. It also possesses a glycosidase that converts inactive glycosylated OL into the active antibiotic [9, 11]. *Streptomyces lividans* is a non-macrolide producer [12], but can inactivate macrolides by glycosylation [13].

*Address correspondence to this author at the Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan; Tel: +81-42-565-0771 (ext. 563); Fax: +81-42-565-3315; E-mail: kubomayu@nih.go.jp

The resistance mechanisms of MLS antibiotic-producing microorganisms are summarized in Table 1.

1. Macrolide Antibiotics

The study of bacterial ability to modify or degrade macrolide antibiotics started in 1964. The disappearance of erythromycin (EM) in the culture media of steroid-transforming strains of *Streptomyces* or *Nocardia* and EM-A inactivation by *Pseudomonas* in soil were reported by Feldman *et al.* [14] and Flickinger *et al.* [15], respectively. Nakahama *et al.* [16-18] then reported the deacylation and the hydroxylation of maridomycin, spiramycin, and josamycin (16-membered macrolides).

1-1. Phosphorylation

Phosphorylation of antibiotics by microorganisms is a well-known inactivation mechanism *in vivo*. Phosphorylating enzymes are widely distributed among *Streptomyces* spp. and are also found in other genera. Crude phosphorylating enzyme of *Streptomyces coelicolor* in the presence of ATP and Mg²⁺ catalyzes the conversion of oleandomycin, tylosin, and spiramycin to inactive 2'-O-phosphates. Under the same conditions, erythromycin was converted to anhydroerythromycin 2'-O-phosphate [19, 20]. Fig. (1) shows the structures of the substrate antibiotics and phosphorylation products.

1-2. Glycosylation

Microbial glycosylation of erythromycin A (EM-A) was observed in *Streptomyces vendargensis* [21] and the inacti-

Table 1. Inactivation of MLS-antibiotics by Antibiotic Producers and Other Organisms.

MLS antibiotics Resistance profile	Organism	Inactivated antibiotics	Gene	GenBank number	Reference	
Macrolide						
Phosphorylation Glycosylation	<i>Streptomyces coelicolor</i> Muller	EM-A, OL, TL, LMA ₃ , SPM		M74717	[19, 20]	
	<i>Streptomyces lividans</i> TK21	EM, TL, RSM, AZM, TL	<i>mgt</i>	AF055579	[12, 22, 23]	
Deacylation	<i>Streptomyces antibioticus</i> ATCC11891	OL, RSM, MET, LAN	<i>oleI</i>	Z22577	[9-11, 29, 30]	
	<i>Streptomyces vendargensis</i> UC5315	EM		AJ223970	[21]	
	<i>Streptomyces antibioticus</i>	OL	<i>oleD</i>		[24]	
	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> ATCC11635	AVE			[31]	
	<i>Streptomyces ambifaciens</i> ATCC23877	RSM, OL, CHA, TL	<i>gimA</i>		[32]	
	<i>Bacillus megaterium</i> 91277	MAR, SPM			[16]	
	<i>Streptomyces olivaceus</i> 219	MAR, JM			[17, 18]	
	<i>Streptomyces pisticinaespiralis</i> IFO13074	MAR			[18]	
	N. C.	<i>Pseudomonas</i> 56	EM-A			[15]
	Lincosamide					
Phosphorylation Phosphorylation/ Ribonucleotidylation	<i>Streptomyces rochei</i>	LCM			[36]	
	<i>Streptomyces coelicolor</i> Muller	CLDM, LCM, PIR			[37-40]	
Streptogramin						
Hydrolysis	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	DHS-S			[42]	
	<i>Streptomyces mitakaensis</i>	MKM-B			[43, 44]	
	<i>Streptomyces diastaticus</i> NRRL2650	VER-A and B, PR-I and II,			[45]	
	<i>Streptomyces loidensis</i> ATCC11415	OST-A and B, VM-1 and M2				
	<i>Streptomyces olivaceus</i> ATCC12019					
Reduction	<i>Streptomyces virginiae</i>	VIR-M1			[41, 46]	

Abbreviations: EM, erythromycin; OL, oleandomycin; TL, tylosin; LMA₃, leucomycin A₃; SPM, spiramycin; RSM, rosamicin; AZM, azithromycin; MET, methymycin; LAN, lankamycin; AVE, avermectin; CHA, chalcocomycin; MAR, maridomycin; JM, rosamycin; LCM, lincomycin; CLDM, clindamycin; PIR, pirlimycin; DHS, dihydrostaphylomycin; MKM, mikamycin; VER, vernamycin; PR, pristinamycin; OST, osteogrycin; V, vernamycin; VIR, virginiamycin. N. C., not clear.

vated product was identified as 2'-(O-[β-D-glucopyranosyl]) EM-A (Fig. 2). This product lacked antibiotic activity when tested against several Gram-positive pathogens, as well as *S. vendargensis* (Table 2).

In 1991, Cundliffe [22, 23] reported an inducible gene, *mgt*, in *Streptomyces lividans*, which inactivates macrolides by UDP-glucose-dependent glycosylation at the 2'-OH of the sugar moieties attached to C-5 of 14- and 15-membered lactones and to C-3 of 12-membered lactones. This enzyme (Mgt) shows a preference for monosaccharide derivatives over disaccharide derivatives. The substrates of Mgt are 12-, 14-, and 15-membered macrolides, or 16-membered lactones (as in methymycin, erythromycin, azithromycin, or tylosin), although spiramycin and carbomycin were apparently not modified. This organism expresses another gene, *lrm* that is linked with *mgt*, encoding a 23S rRNA methyltransferase that confers high resistance to lincomycin, together with lower resistance to macrolides. The deduced *lrm* product is a 26-kDa protein with considerable similarity to other 23S rRNA methyltransferases, such as the *carB*, *tlrA* and *ermE* gene products. The *mgt* gene consists of 1257 bp and encodes a 42-kDa protein. The *lrm* and *mgt* genes occur in tandem in the chromosome, and their expression may be transcriptionally and translationally coupled, since their coding sequences overlap.

A 3.3-kb DNA fragment from the oleandomycin (OL) producer, *Streptomyces antibioticus*, was found to consist of the 3' end of a gene (ORF1) and two complete ORFs (ORF2 and OleD) [24, 25]. The deduced product of the sequenced region of ORF1 contained transmembrane domains characteristic of transport proteins. The ORF2 product contained an N-terminal leader peptide region characteristic of a secretory protein, and a lipid attachment site motif characteristic of membrane lipoproteins synthesized with a precursor signal peptide. The *oleD* gene product showed clear similarity with several UDP-glucuronosyl and UDP-glycosyl transferases of various origins and was especially similar to the *S. lividans mgt* gene product, which is thought to encode a glycosyltransferase capable of inactivating macrolides. The *orf1*, *orf2*, and *oleD* gene products may participate in the intracellular glycosylation of OL and the secretion of glycosylated OL during antibiotic production.

In the study on *oleD*, it was reported that cell extracts of *S. antibioticus* could inactivate OL in the presence of UDP-glucose [9-11]. This enzyme also inactivated other macrolides (rosamicin, methymycin and lincomycin) containing a free 2'-OH group in a monosaccharide linked to the lactone ring (except for erythromycin) (Fig. 3), but not those containing a disaccharide (tylosin, spiramycin, carbomycin, josamycin, and neomycin), and seems to function in the biosynthetic

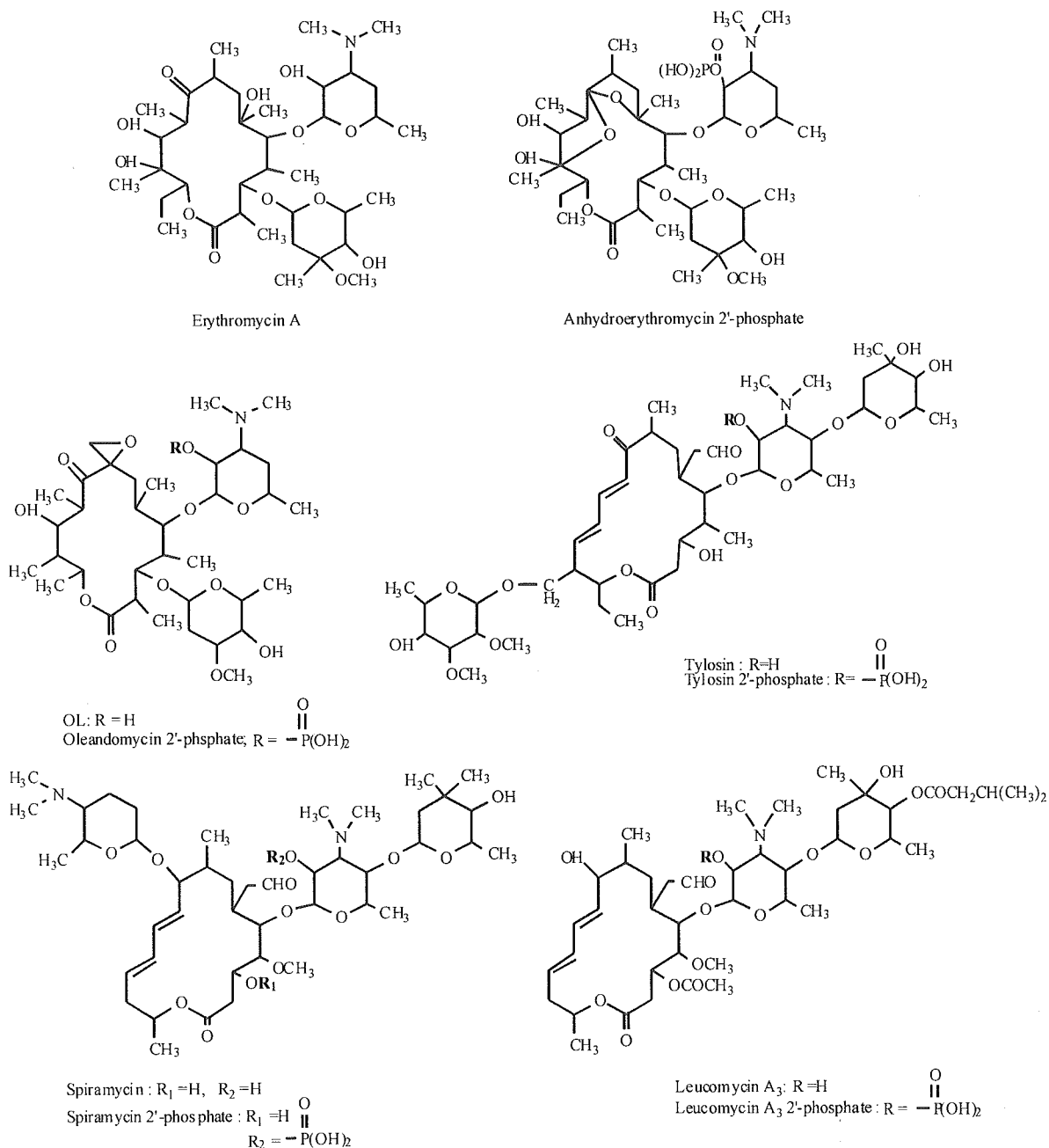


Fig. (1). Structures of substrate and product of erythromycin A, oleandomycin, tylosin, spiramycin I, and leucomycin A₃.

pathway to OL. The culture supernatant of *S. antibioticus* contained another enzyme activity capable of reactivating the glycosylated OL and regenerating the biological activity with the release of a glucose molecule. These two enzyme activities could be an integral part of the OL biosynthetic pathway. OL binds first to the enzyme, followed by UDP-glucose. The ternary complex is thus formed prior to transfer of glucose. UDP is released, followed by the glycosylated

OL, and this is the final intracellular product (Fig. 4). The OleB transporter would be responsible for transmembrane secretion [25-28] of this inactive molecule, which would then be extracellularly reactivated by the product of the *oleR* gene. Sequencing analysis of a 5.2-kb region from the OL gene cluster located between the OL polyketide synthesis gene and sugar biosynthetic gene in *S. antibioticus* revealed the presence of three open reading frames (designated *oleI*,

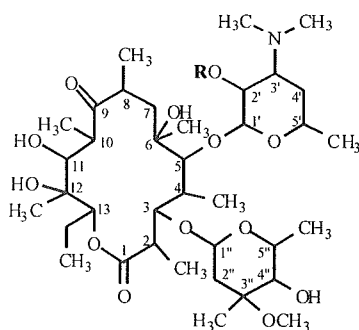


Fig. (2). Structures of erythromycin A (R =H) and 2'-O-[β-D-glucopyranosyl] erythromycin A (R = glucose).

oleN2 and *oleR*) [29]. The *oleI* gene product resembles other glycosyl-transferases involved in macrolide inactivation, including the *oleD* gene product, a previously described glycosyltransferase from *Streptococcus antibioticus*. The *oleN2* gene product showed similarity with various aminotransferases involved in the biosynthesis of 6-deoxyhexose, and the *oleR* gene product was similar to glucosidases of several origins. The sugar moieties are transferred to a different aglycon by glycosyltransferases such as *OleI* [30]. The sugar donor was UDP- α -glucose, though the glycosylated product showed a β -glycoside linkage. The changes in the sugar composition of these molecules may influence the important biological actions of glucosylated OL on ribosomes [29].

Another glycosyltransferase, specific for macrolide monosaccharide, generates a disaccharide linked to the aglycon [31]. Avermectin and ivermectin, a family of oleandrose-containing disaccharide derivatives of 16-membered macrolides produced by *Streptomyces avermitilis*, are glycosylated at C-4'' and C-4' by both growing and resting cells of *Saccharopolyspora erythraea* (Fig. 5). The specificity of the *S. erythraea* enzyme of the glycosyl donor is different from that of the *S. lividans* enzyme. Glycosylated products were formed *in vitro* with UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-mannose, and UDP-glucouronic acid, but not with UDP-xylose, UDP-N-acetylglucosamine, UDP-N-acetylgalactosamine, or UDP-galactouronic acid. Only the product with UDP-glucose was formed in sufficient quantity

to permit its identification. The enzyme in *Streptomyces lividans* utilized only UDP-glucose and UDP-galactose (Table 3). The *S. lividans* glycosyltransferase, which confers resistance, was induced by substrate macrolides and not by non-substrate macrolides, though that of *S. erythraea* appeared to be constitutive.

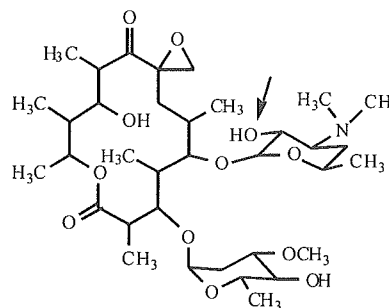


Fig. (3). Chemical structure of oleandomycin. The arrow indicates the hydroxyl group considered to be a potential site for glycosylation.

Streptomyces ambofaciens produces spiramycin, a 16-membered macrolide, and has the *gimA* gene (conferring resistance to spiramycin) downstream of the *srmA* gene, which encodes an rRNA monomethylase [32]. The *gimA* gene product shows a high degree of similarity to the *mgt* gene product in *S. lividans*. In a cloning experiment using a susceptible host mutant of *S. lividans* lacking macrolide-inactivating glycosyltransferase activity, the cloned *gimA* gene was expressed in the presence of UDP-glucose. That is, cell extracts from mutated *S. lividans* could inactivate various macrolides by glycosylation. Spiramycin was not inactivated, but forocidine, a spiramycin precursor, was modified. In *S. ambofaciens*, *gimA* could confer a low level of resistance to some macrolides even under conditions where spiramycin was produced. The putative GTG start codon of the *gimA* gene overlapped with the *srmA* stop codon (GTGA). The ORF of the *gimA* gene consisted of 1254 bp and encoded a 45-kDa protein. The deduced protein showed high homology with the deduced proteins derived from *mgt* of *S. lividans* (82%) [12] and *oleD* of *S. antibioticus* (72%) [24]. Table 4 shows the degree of identity of the DNA and amino acid sequences for four

Table 2. MIC Values of Erythromycin A (EM-A) and 2'-O-[β-D-glucopyranosyl]EM- A for *Staphylococcus* and *Streptococcus* Strains [21].

Organism	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	EM-A	2'-O-[β-D-glucopyranosyl]EM-A
<i>Staphylococcus aureus</i> 9218 and 9271	0.5	>32
<i>Streptococcus faecalis</i> 9217	2	>32
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 41	0.06	32
<i>Streptococcus pyogenes</i> 152	0.03	16
<i>Streptococcus vendargensis</i> 5315	50	1000

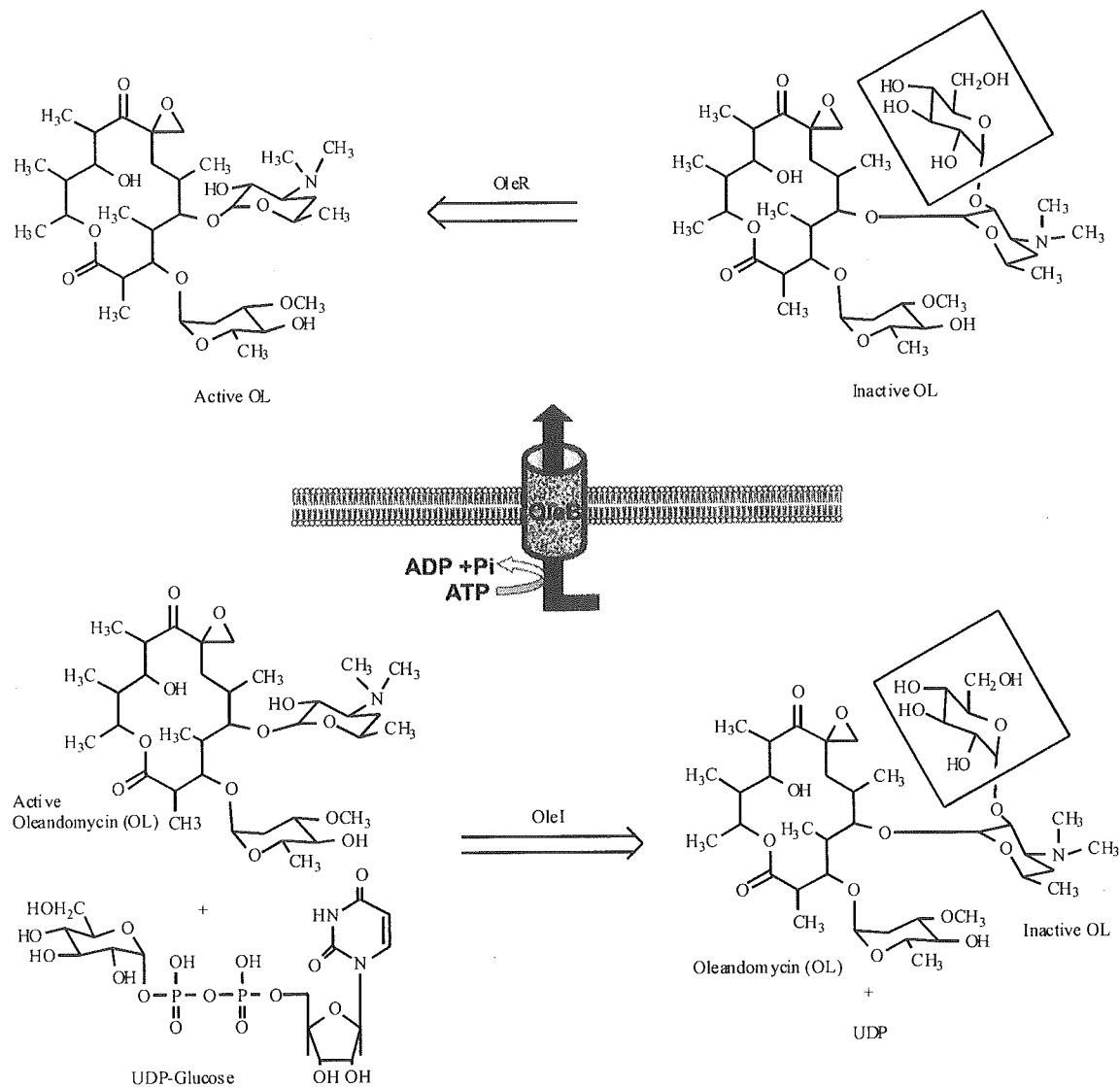


Fig. (4). Strategy for self-protection by oleandomycin producers. Intracellular glycosylation of oleandomycin to an inactive precursor is catalyzed by OleI, then the precursor is pumped out by OleB, and reactivated extracellularly by the glycosidase OleR [28, 29].

glycosyltransferase genes, *mgt*, *oleI*, *oleD*, and *gimA*, from different *Streptomyces* spp. In *Streptomyces ambifaciens*, *gimA* was found just downstream of *srmA*, which encodes an rRNA methyltransferase that confers macrolide resistance by target modification [32]. As shown in Fig. (6), the glycosyltransferase genes *gimA* and *mgt* are linked with methyltransferase genes, *srmA* in *S. ambifaciens* and *lrm* in *S. lividans*. For *S. antibioticus*, no methyltransferase gene was found upstream of *oleD* or *oleI*. This is in agreement with the observation that ribosomes from *S. antibioticus* are sensitive to OL, even during macrolide production [33]. Upstream of *oleD* are two ORFs, ORF1 and ORF2, which have high degrees of similarity to those of upstream of *srmA*. Thus, some deletion or insertion events may have occurred at the corresponding loci in *S. ambifaciens* or in *S.*

antibioticus. The region located upstream of *lrm* in *S. lividans* is completely different from those in the other two strains. This observation suggests that glycosyltransferases like that in *S. vendargensis* are widespread among *Streptomyces* spp [13].

The alignment of the deduced amino acid sequences of three macrolide glycosyltransferases, Mgt from *S. lividans* [12], GimA from *S. ambifaciens* [32] and OleD from *S. antibioticus* [24], is shown in Fig. (7). These proteins contain well-conserved amino acid sequences. Analysis of the amino acid sequences of several glycosyltransferases involved in the biosynthesis of polyketides also showed very well conserved regions, including one of two histidine residues [30]. The conserved histidine seems to play an important role in the catalytic activity of the enzyme and in substrate binding

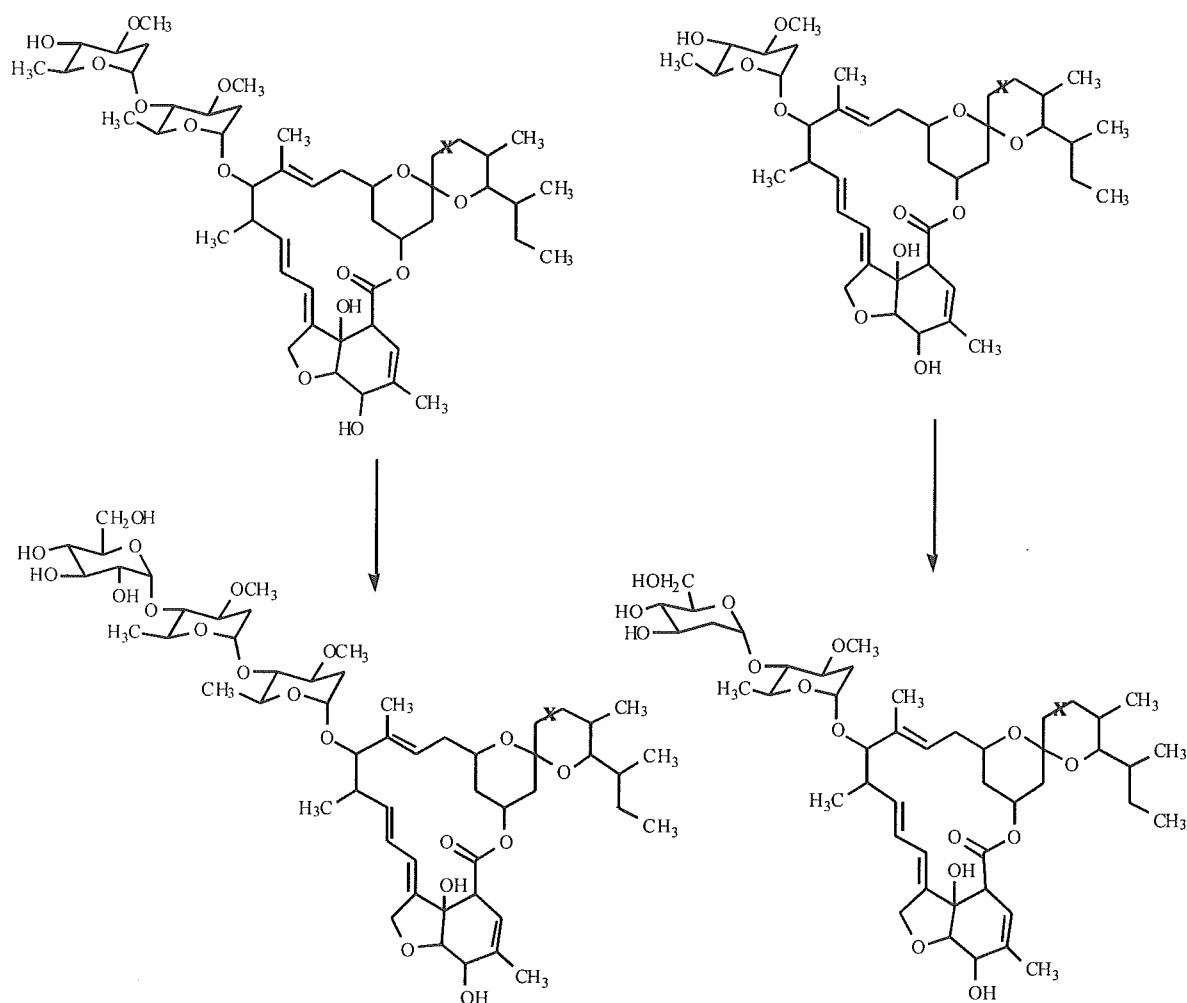


Fig. (5). Glycosylations of evermectin disaccharide and monosaccharide by *Saccharopolyspora*. X, CH₂-CH₂ in invermectin derivatives and CH=CH in avermectin derivatives.

or transition site stabilization in some oligosaccharide-dependent glycosyltransferases.

Table 3. Glycosyl Donors for Glycosyltransferases of *Streptomyces* spp [31].

Glycosyltransferase of	
<i>Streptomyces lividans</i>	<i>Streptomyces erythraea</i>
UDP-glucose	UDP-glucose
UDP-galactose	UDP-galactose
	UDP-mannose
	UDP-glucouronic acid

1-3. Deacylation

Deacylation of 16-membered macrolide antibiotics was reported by Nakahama *et al.* [16, 18]. Maridomycin, as well as spiramycin, was deacylated by esterase from *Bacillus*

magerium, *Streptomyces pristinaespiralis* and *Streptomyces olivaceus*. Figure (8) shows the deacylation of maridomycin III (MDM III), 9-propionylmaridomycin III (PMDM III) and

Table 4. Homology (%) of DNA and Amino Acid Sequences of Glycosyltransferases from *Streptomyces* spp.

Combination of genes	Homology (%) of	
	DNA	Amino Acid
<i>mgt - gimA</i>	86	82
<i>mgt - oleD</i>	75	72
<i>mgt - oleI</i>	60	40
<i>gimA - oleD</i>	75	72
<i>gimA - oleI</i>	62	41
<i>oleD - oleI</i>	58	38

Accession numbers of genes used for homology analysis were the same as in Table 1.

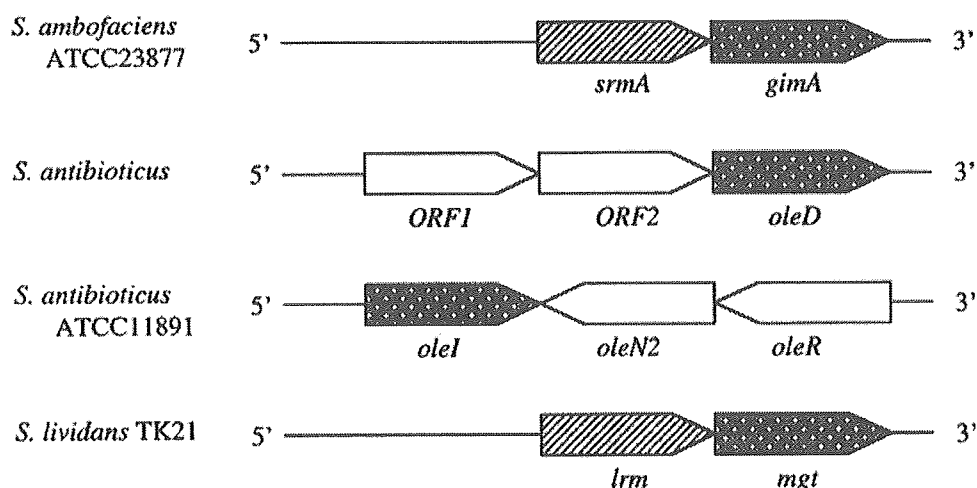


Fig. (6). Comparison of the genetic environments around macrolide resistance genes in various *Streptomyces* spp. *gimA* [32], *oleD* [24], *oleI* [29], and *mgt* [12] encode glycosyltransferase and *srmA* and *lrm* encode methyltransferase.

4"-depropionyl-9-propionylmaridomycin III (PMDM III-M) to 4"-depropionylmaridomycin III (MDM III-M) by an esterase of *Streptomyces* spp. In *B. megaterium*, MDM III and PMDM III are hydrolyzed to MDM III-M and PMDM III-M [16]. *S. olivaceus* also participates in the hydroxylation of maridomycin I (MDM I) to 3"-hydroxylmaridomycin (HMDM I), as shown in Fig. (9) [17]. Josamycin (JM) was also hydroxylated to 3"-hydroxyjosamycin (HJM) by the same strain, and hydroxylated derivatives of HMD I and HJM exhibited weaker antimicrobial activities [17].

2. Lincosamide Antibiotics

Inactivation studies on lincosamide antibiotics, including lincomycin and clindamycin, have been performed by Argoudelis *et al.* They examined the transformation of lincomycin to lincomycin sulfoxide and 1'-demethylthio-1-hydroxylincomycin by *Streptomyces lincolnensis* [34, 35] and the phosphorylation of lincomycin to lincomycin-3-phosphate by *Streptomyces rochei* [36] (Fig. 10). These compounds showed loss of the antimicrobial activity during fermentation or growth in a synthetic medium containing *S. lincolnensis* or *S. rochei*, indicating that several *Streptomyces* spp. possess an intrinsic ability to inactivate lincomycin.

Clindamycin is a clinically useful derivative of lincomycin. *Streptomyces coelicolor* completely inactivated clindamycin in less than 48 hr when the antibiotic was added to 24-hr cultures of the organism grown in a complex medium [37]. Clindamycin could be regenerated by treatment of the inactivated fermentation broth with either crude alkaline phosphatase or snake venom phosphodiesterase. This enzymatic behavior suggests that *S. coelicolor* converted clindamycin to compound(s) containing a phosphodiester bond(s). Argoudelis *et al.* have proposed that clindamycin is phosphorylated to clindamycin-3-phosphate [38] and ribonucleotidylated to clindamycin 3-ribonucleotide by *S. coelicolor* [37-39] (Fig. 11). Enzymic nucleotidylation of lincosamide antibiotics [40] required Mg^{2+} and nucleoside-5'-triphosphates when examined with crude enzyme

preparation from *S. coelicolor* in medium maintained at around pH 6.

3. Streptogramin Antibiotics

Streptogramin family antibiotics consist of two groups of components, type A and type B, exemplified by virginiamycin M and virginiamycin S, respectively [41] (Fig. 12). To date, very few investigations of inactivation in this family have been reported. Hou *et al.* obtained an antibiotic lactonase with a molecular weight of 35,000 from *Actinoplanes missouriensis*, and this enzyme hydrolyzed the lactone bond of dihydrostaphylomycin S (a type B streptogramin antibiotic) [42]. Mikamycin lactonase from *Streptomyces mitakaensis*, a producer of mikamycin A and B, was purified and characterized, and the structure of the reaction product, mikamycin-B acid, was identified [43, 44] (Fig. 13). This enzyme has a molecular weight of 29,000 and catalyzes the hydrolytic degradation of mikamycin B. The reason for the difference of molecular weight is of interest, since both enzymes appear to hydrolyze the lactone linkage of type B streptogramin acid.

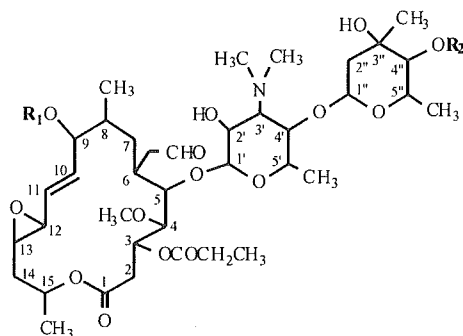
The inactivation of streptogramins in *Streptomyces* spp. other than *S. mitakaensis* was examined by Fernando Fierro *et al.* [45]. *Streptomyces diastaticus*, *Streptomyces loidensis*, and *Streptomyces olivaceus* were quite sensitive to most of the macrolides and lincosamides examined, but resistant to both A (or M) and B (or S) streptogramin components. This phenotypical trait was also observed in inactivation assay using cell-free extracts of the producers and type A and B streptogramin antibiotics. Though the mechanism of this inactivation is not clear, it could be lactone hydrolysis, as mentioned above.

In contrast to the lactone ring hydrolysis by mikamycin B-lactonase, inactivation of virginiamycin M1 from *Streptomyces virginiae* involved reduction of the C-16 carbonyl group [41, 46] (Fig. 14).

Mgt	1	MKRKELHETSRLAYGRRMTRPAHIAMFSIALHGHVNPSEVIRELVARGHRVYAI PRL	60
GimA	1	VRRGDLHETYRLDYAPHMHDPAHIAMFS - IAAHGHVNPSEVIRELVARGHRVYAI PPL	59
OleD	1	-----VTTQTTPAHIAMFSIAAHGHVNPSEVIRELVARGHRVYAI PPV	45

Mgt	61	LADKVAEAGAEPKLNWSTLPGPDADPEAWGSTLLDNVEPFLADA IQSLPQLAQAYEGDEP	120
GimA	60	FAEKVAETGAEPKLNWSTLPGPDADPDWGTTPLDNVEPFLDDA IQALPQLIAAYEGDEP	119
OleD	46	FADKVAATGPRPVLVYHSTLPGPDADPEAWGSTLLDNRRFLNDA IQALPQLADAYADDIP	105
		* *	
Mgt	121	DLVLHDIASYTARVLGRRWEVPIVSLSPCMVAWEGYEQEVGPEMWEEPRKTERGQAYAR	180
GimA	120	DLVLHDI TSYPARVLAHRWCVPAVSLSPNLVAWEGYEEVGRPTWEEPLKTERGRAYDAR	179
OleD	106	DLVLHDI TSYPARVLA RRWCVPAVSLSPNLVAWKGYEEVAEPMWREPRQTERGRAYAR	165
		***** *	
Mgt	181	FHAWLEENGITDHPDPFIGRPDRSLVLI PKALQPHADRVEDTYYTFVGACQGDRTAEGDW	240
GimA	180	FRGWLKENGITEDPDPFVGRPDRSLVLI PKALQPHADRVEDKTHTFVGACQGDRAAEGDW	239
OleD	166	FEAWLKENGITEHPDTFASHPPRSLVLI PKALQPHADRVEDVYTFVGACQGDRAEEGGW	225
		* *	
Mgt	241	ARPEGAEKVVLVSLGSAFTKQPAFYRECVRAFGE L PGWHTVLQVGRHVDPAELGDVPDNV	300
GimA	240	RRPEGAEKVVLVSLGSSFTKRP AFYRACVEAFGALPGWHVVLQVGRHVDPAELGDVPENV	299
OleD	226	QRPAEAKVVLVSLGSAFTKQPAFYRECVRAFGNLPGWHLVLQI GRKVT PAELGELPDNV	285
		* *	
		↓	
Mgt	301	EVRTWVPQLAILQADLFVTHAGAGGSQEGLATATPMI AVPQAADQFGNADMLQGLGVAR	360
GimA	300	EVRSWVPQLAILKQADLFVTHAGAGGSQEGLATATPI VAVPQAVDQFGNADMLQGLGVGR	359
OleD	286	EVHDWVPQLAILRQADLFVTHAGAGGSQEGLATATPMI AVPQAVDQFGNADMLQGLGVAR	345
		* *	
Mgt	361	TLPTEEATAKALRTAALALVDDPEVAARLKEIQARMAQEAGTRGPADLIEAELAAARG--	418
GimA	360	HLPTEEATAEALRAAGLALVEDPEVARRLKEIQAGMAREGGTRRAADLIEAELAAART--	417
OleD	346	KLATEEATADLLRETALALVDDPEVARRLRRIQAEMAQEGGTRRAADLIEAELPARHERQ	405
		* *	
Mgt	419	-----	443
GimA	418	-----	442
OleD	406	EPVGD RPNVGD R P A G V R S D R Q R S A L	430

Fig. (7). Alignment of the deduced amino acid sequences of three macrolide glycosyltransferases, Mgt [12], GimA [32] and OleD [24]. The histidine residue shown by the arrow seems to play an important role in the catalytic activity of the enzyme and in substrate binding or transition site stabilization in some oligosaccharide-dependent glycosyltransferases.



(Fig. (8). Contd....)

	R ₁	R ₂
Maridomycin II (MDM III)	H	COCH ₂ CH ₃
4"-depropionylmaridomycin III (MDM III-M)	H	H
9-propionylmaridomycin III (PMDM III)	COCH ₂ CH ₃	COCH ₂ CH ₃
4"-depropionyl-9-propionylmaridomycin III (PMDM III-M)	COCH ₂ CH ₃	H

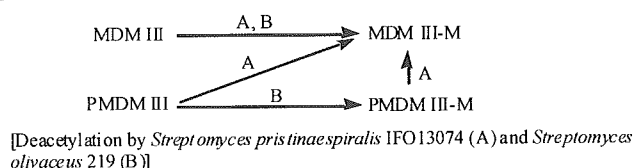


Fig. (8). Deacetylation of maridomycin III (MDM III), 9-propionylmaridomycin III (PMDM III) and 9-propionylmaridomycin III (PMDM III-M) by *Streptomyces pristinaespiralis* IFO13074 and *Streptomyces olivaceus* 219 [18].

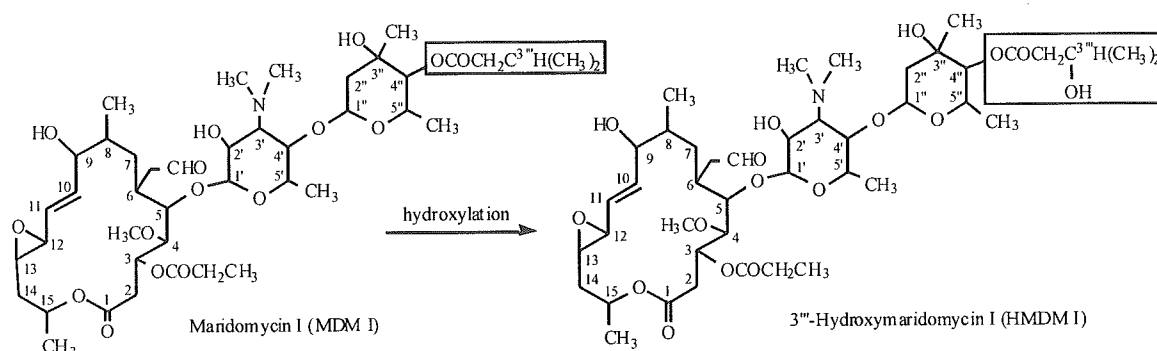


Fig. (9). Hydroxylation of MDM I to HMDM I by *Streptomyces olivaceus* 219 [17].

(B) PATHOGENS

Bacterial inactivation of antibiotics affects only structurally related antibiotics, and is different in this respect from target modification, such as dimethylation of 23S rRNA (the target site of macrolide, lincosamide and streptogramin (MLS) antibiotics). Interestingly, enzymatic inactivation of macrolides appears to be unusual in clinical

isolates compared with resistance due to target site modification or efflux [47-52].

Hydrolysis by esterase [53-57] and phosphorylation [58, 59] by phosphotransferase were observed in Gram-negative bacteria such as *E. coli* originally, and in *Providencia stuartii* [56] in recent years. However, the G+C content suggests that the phosphotransferases from Gram-negative bacteria

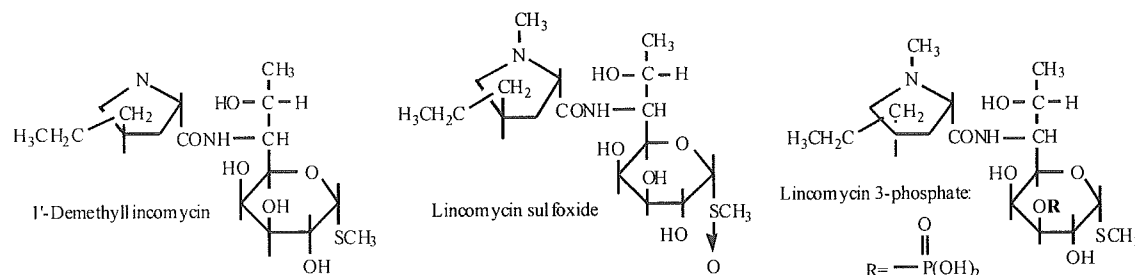


Fig. (10). Structures of 1'-demethylated lincomycin [34], lincomycin sulfoxide [35], and 3-phosphorylated lincomycin [36].