

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

- 新規プラスミド媒介性 16S rRNA Methyltransferase, RmtC の解析 -

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

緑膿菌およびセラチアなどのグラム陰性桿菌にアミノグリコシド(以下 AG)耐性を付与する新規メカニズムとして、我々はプラスミド媒介性 16S rRNA Methyltransferase 遺伝子(*rmtA*)の存在を 2003 年に初めて報告した。現在までに、*rmtB*, *armA* といった別種の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子をもつグラム陰性桿菌が存在することも明らかとなっている。16S rRNA methyltransferase は AG を産生する放線菌が、自己の 16S rRNA をメチル化し保護するために産生する酵素であり、自然界に広く存在する。今後、緑膿菌、セラチアなどのグラム陰性桿菌がこれら放線菌から新たな 16S rRNA methyltransferase 遺伝子を得て、更なる AG 耐性を獲得することが懸念される。

我々は過去に国内の医療施設で分離され細菌第二部に保存されていたグラム陰性桿菌を対象に、既存の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子(*rmtA*, *rmtB*, *armA*)以外の新規 16S rRNA methyltransferase 遺伝子を持つ株の有無について検討を行った。その結果、プロテウスミラビリス ARS68 株より新規プラスミド媒介性 16S rRNA methyltransferase 遺伝子(*rmtC*)を発見した。

今後、院内感染症、術後感染症、日和見感染症の原因となる種々の臨床分離株が、この種の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子を新たに獲得することにより AG 耐性化を増す危険性があり、それを防止する為に調査と監視を継続しつつ、さらに実効ある対策を講じる事が急務となっている。

研究協力者：

和知野純一、山根一和、鈴木里和、柴田尚宏、木村幸司、甲斐久美子(国立感染症研究所 細菌第二部)

A. 研究目的

アミノグリコシド(以下 AG)はグラム陽性菌からグラム陰性菌に至るまで幅広い抗菌活性を示し、医療現場並びに家畜の腸炎や乳腺炎などの治療の為に、畜産現場において広く使用されている。一方、細菌は AG に対する耐性メカニズムとしてアセチル化酵素、リン酸化酵素、アデニル化酵素など種々の AG 修飾酵素を獲得してきた。AG 修飾酵素は、現在においてもグラム陰性菌、グラム陽性菌の両者において AG に対する主要な耐性機構である。

アルペカシン(以下 ABK)はこれら AG 修飾酵素による耐性化機構を回避することを想定し

て設計され、日本では 1990 年にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染症の治療薬として認可され、現在臨床現場で広く用いられている。

しかし、ABK を含めた多くの AG に対して耐性を付与する新規耐性メカニズムとして、プラスミド媒介性 16S rRNA methyltransferase 遺伝子(*rmtA*)が緑膿菌から発見された。また、*rmtB* や *armA* といった別種のプラスミド媒介性 16S rRNA methyltransferase 遺伝子を有する大腸菌や肺炎桿菌なども国内のみならず国外からも散見されるようになり、16S rRNA methyltransferase 遺伝子獲得による AG 耐性化が進行している傾向が伺える。今後、新規の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子を獲得した細菌が医療現場に出現し、化学療法の際に大きな障害となることが懸念される。

本研究では既存の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子(*rmtA*, *rmtB*, *armA*)以外の新規 16S rRNA methyltransferase 遺伝子を持つ臨床分離株の存在

について検討、解析を行った。

## B. 研究方法

1. 16S rRNA methyltransferase を産生する株は、ABK に高度耐性(MIC, >1024 $\mu$ g/ml)を示す事がこれまでの研究で明らかとなっている。そこで、過去に分離され細菌第二部に保存されていたグラム陰性桿菌から、ABK に高度耐性(MIC, >1024 $\mu$ g/ml)を示す株を選び、PCR による既存の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子の検出を試みた。
2. ABK 高度耐性にも関わらず PCR により既存の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子の存在が否定された株を対象に、分子生物学的手法を用いてその支配因子の決定及び機能解析を行った。
3. MIC(最小発育阻止濃度)については CLSI 法に準じて行った。

## C. 研究結果

過去に国内の医療施設で分離され細菌第二部に保存されていた ABK 高度耐性グラム陰性桿菌について、既存の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子(*rmtA*, *armA*, *rmtB*)の有無を調べたところ、多くの株がいずれかの 16S rRNA methyltransferase 遺伝子を保有していることが判明した。しかし、*Proteus mirabilis* ARS68 株は ABK 高度耐性にも関わらず、既存の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子の保有していなかった。そこで、ABK 耐性支配因子の決定を試みた結果、新規の 16S rRNA methyltransferase 遺伝子(*rmtC*)が同定された。

RmtC のアミノ酸 1 次配列を Fig.1 に示す。RmtC は既存の 16S rRNA methyltransferase とアミノ酸レベルでの相同性が 30%以下であった(Table 1)。また、それらをもとにしたデンドログラムを Fig.2 に示す。*rmtC* は 4-6 disubstituted deoxystreptamine であるアミカシンやゲンタマイシンなどに耐性を付与するものの、化学構造の異なる 4-5 disubstituted deoxystreptamine であるネオマイシンやストレプトマイシンには耐性を付与しなかった(Table 2)。

*rmtC* はプラスミド上にあり、その上流にはト

ランスポゼースをコードする *tnpA* が存在した (Fig 3)。His-tag を使用して精製した RmtC は大腸菌より抽出した 30S subunit に対してメチルトランスフェラーゼ活性を有した(Fig 4)。

## D. 考察

国内では、これまでに RmtA、RmtB、ArmA の 3 種類の 16S rRNA methyltransferase 産生株が確認されていたが、本研究により新たに RmtC 型の 16S rRNA methyltransferase 産生株の存在が確認された。*rmtC* はトランスポゼース(TnpA)を含む遺伝子転移ユニットである *ISEcp1* の下流に位置し、*rmtC* の遺伝子間の移動には *ISEcp1* が深く関与しているものと考えられた。*ISEcp1* は CTX-M 型や CMY 型の $\beta$ -lactamase 遺伝子の伝播拡散に関与している事が既に報告されており、グラム陰性菌の間で *ISEcp1* を介した *rmtC* の伝播拡散が強く懸念される。

## E. 結論

本研究により、新型 16S rRNA methyltransferase 遺伝子(*rmtC*)を有する *Proteus mirabilis* が新たに確認された。*armA* や *rmtB* を保有する腸内細菌科に属する細菌は日本のみならず、台湾、韓国及びヨーロッパ各国から分離されており、16S rRNA methyltransferase 産生株が世界規模で蔓延し始めていると考えられる。また、これら 16S rRNA methyltransferase 産生株は医療環境のみならず畜産環境で分離された大腸菌からも確認されている。この事実は、医療環境のみならず、畜産環境においても 16S rRNA methyltransferase 産生株を選択する圧力が生じている事を示唆しており、このような耐性株の起源及び拡散を考える上で興味深い。

## F. 健康危険情報

臨床的に有用なほぼ全てのアミノ配糖体(半合成アミノグリコシドを含む)に対し、高度耐性を付与する新規 16S rRNA methyltransferase (RmtC) を産生するグラム陰性桿菌が、我が国の医療現場に存在することが確認された。

海外では、16S rRNA methyltransferase 産生株が豚から分離された大腸菌においても確認されている。畜産現場では家畜の腸炎や乳腺炎などの治療の為、カナマイシンなどのアミノグリコシドが広く用いられている事から、この種の耐性菌が畜産環境で発生し人の医療環境に侵入している可能性もあり、食の安全を確保する上でも、検疫所、屠畜場、食肉衛生検査所などにおいて、食肉付着菌のアミノ配糖体耐性に関する早急な調査が必要と考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. K. Yokoyama, Y. Doi, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, H. Kato, Y. Arakawa. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 2003; 362: 1888-1993.
2. Y. Doi, K. Yokoyama, K. Yamane, J. Wachino, N. Shibata, T. Yagi, K. Shibayama, H. Kato, Y. Arakawa. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycoside. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 491-496.
3. Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jun;48(6):2069-74.
4. Yamane K, Wachino J, Doi Y, Kurokawa H, Arakawa Y, Coming Clinical Threat: Worldwide Spread of 16S rRNA Methylase-producing Gram-negative Bacilli, *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11:951-3.
5. J. Wachino, K. Yamane, K. Shibayama, H. Kurokawa, N. Shibata, S. Suzuki, Y. Doi, K. Kimura, Y. Ike, Y. Arakawa. Novel plasmid mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in

a proteus mirabilis isolate demonstrating extraordinary high level of resistance against various aminoglycoside. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 178-184.

### 2. 学会発表

1. K. Yamane, S. Suzuki, J. Wachino, N. Shibata, H. Kato, Y. Arakawa: Diffuse but multifocal proliferations of 16S rRNA methylase producing pan-aminoglycoside resistant gram-negative bacteria in Japan. 45<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC, USA, Dec, 2005.
2. J. Wachino, K. Yamane, K. Shibayama, H. Kurokawa, S. Suzuki, N. Shibata, Y. Arakawa. Novel plasmid mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in *Proteus mirabilis* demonstrating extraordinary high-level of resistance against various aminoglycosides. 45<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington DC, USA, Dec, 2005.

## H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特許申請中 : ( 発明の名称 ) グラム陰性桿菌の 16S rRNA メチラーゼの遺伝子
2. 実用新案登録、その他  
なし

Fig 1.

```

RmtC MKTNDNYIEEVTAKVLTSQKYSTLYPPTVRRVTERLFD RYP-PKQLEKEVRRKKLHQAYGA
RmtA -----MSFDDALASILSSKKYRSLCPDTRRILDQEWGRHKS PKLAVEATRTRLHGICGA
RmtB -----MNINDALTSILASKKYRALCPDTRRILTEEWGRHKS PKQTV EAARTRLHGICGA
ArmA -----MDKNDVVKKILESKKYENLSDIVEKVVSISEKKYK-LKEVENYSKKKLHQIWGS
      ::. .:* * ** * . *.: : : * : : : ** *:

RmtC YIGGIDGKRLEKKIEKIIHEIPNPTTDEATRTEWEKEICLKILNLHTSTNERTVAYDELY
RmtA YVT-----PESLKAAAAALSVG DVQKALSLHASTKERLAELDCLY
RmtB YVT-----PESLKAAAAALSAGDVKKALSLHASTKERLAELDCLY
ArmA YYSAYP-----NWDKLLKKYNQGQLSIEDLLKIHSTNERVATLNDFY
* . *.:*:*:** . : :*

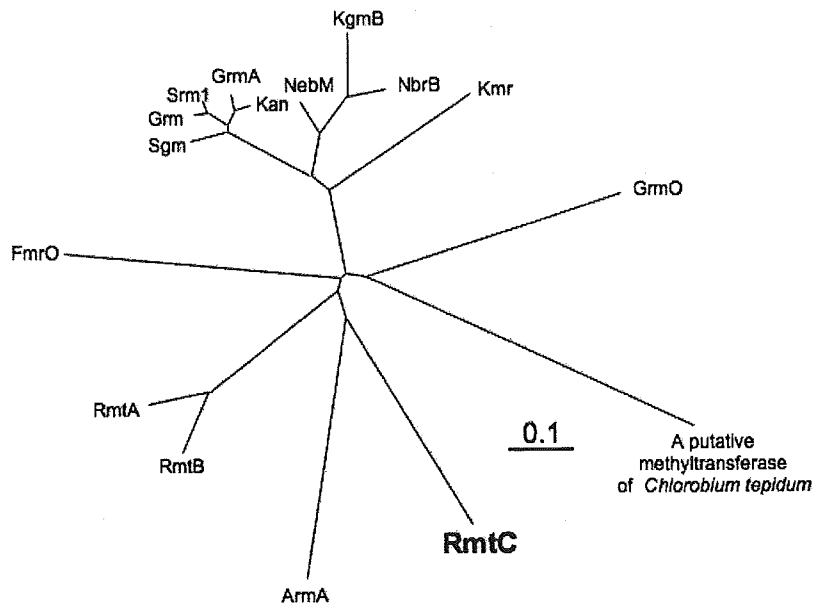
RmtC QKIFEVTVGVP T SITDAGCALNPFSFPFFTEAGMLGQYIGFDL DKGMI EAIEHSLRTL N AP
RmtA DFIFSG-GVPHRVLDIACGLNPLALFIRDITSVWACDIHQGLGDVITPFAHH-----QGL
RmtB DFIFSA-ETPRRVLDIACGLNPLALYERGIASVWGCDIHQGLGDVITPFARE-----KDW
ArmA TYVFGNIKHVSSILDFGCGFNPLALYQWNE NEKI IYHAYDIDRAEIAFLSSIIGKLKTTI
      :* : * .*:*:*: : :

RmtC EGI VVKQGDILSDPSGESDLLLMFKLYTLLDRQEEASGLKILQEWKYKNAVISFPPIKTIS
RmtA DFTFALQDVMCTPPTETGDLALVFKLLPLLEREQAGAAMALLQALATPRIAVSFPTRSLG
RmtB DFTFALQDVL CAPP AEAGDLALIFKLLPLLEREQAGSAMALLQSLNTPRMAVSFPTRSLG
ArmA KYRFLNKESDVYKG--TYDVVFLLKMLPVLK-QQDVNILDFLQLFHTQNFVISFPPIKSL S
      . . : * : :*: : : * . : : : * * . . : ** * : : .

RmtC GRDVGMEENYTVKFENDLVGSDLRIMQK LKLG NEMYFIVSRL--
RmtA GRGKGMEANYSAWFEGALP-DEFEIEDTKTIGIELVYMIKRNK-
RmtB GRGKGMEANYAAWFEGGLP-AEFEIEDKKTIGTELIYLIKKN G-
ArmA GKEKGMEENYQLWFESFTK-GWIKILDSKVIGNELVYITSGFQK
* : ** * * ** . :.* . : * * : : .

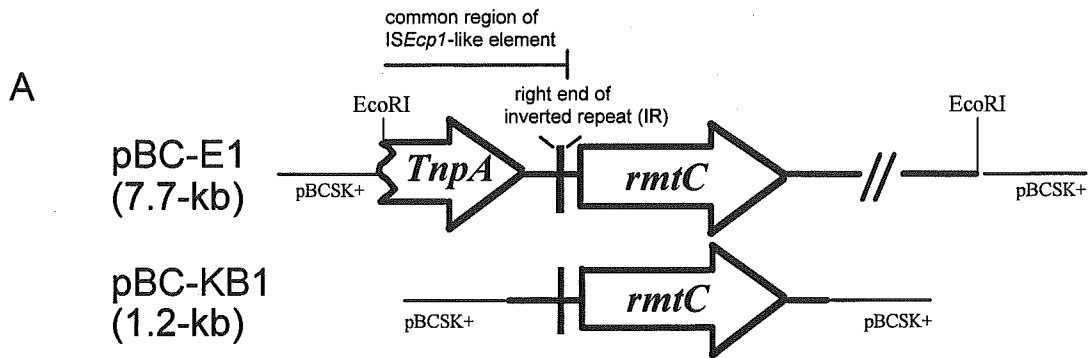
```

Fig 2



Wachino et al.

Fig 3



**B**

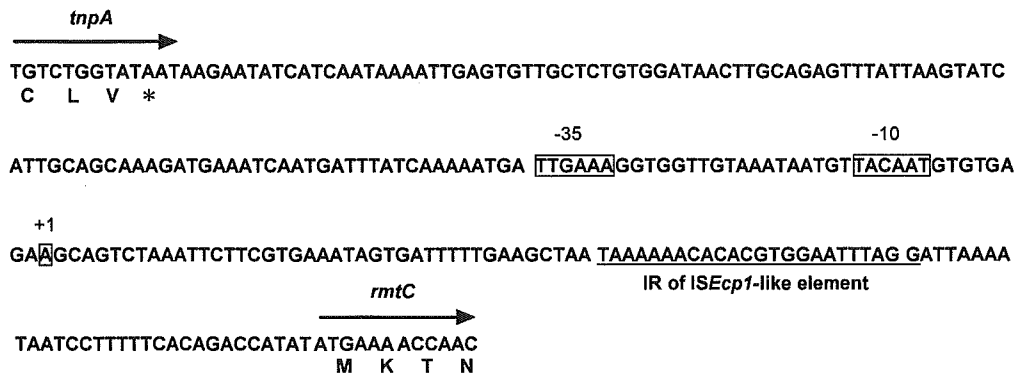
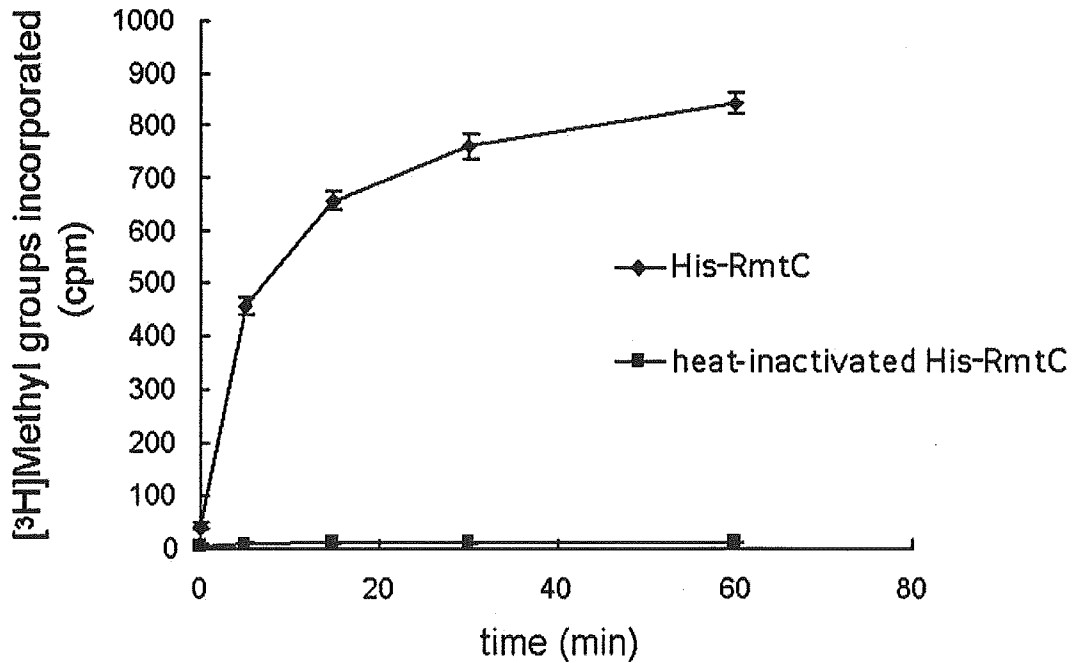


Fig 4



Wachino et al.,

Table 1. Amino acid identities among various 16S rRNA methylases

16S rRNA methylase	G+C content (%)	Identity (%) of amino acid residues								
		Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among pathogenic gram-negative bacilli			Chromosomally encoded 16S rRNA methylases among aminoglycoside-producing actinomycetes					
		RmtC	RmtA	RmtB	ArmA	GrmA	KgmB	GrmO	FmtO	Kmr
RmtC	41.1		27.7	29.5	27.8	26.5	23.1	25.4	23.0	22.0
RmtA	55.4			82.0	29.2	31.7	29.5	28.1	27.3	28.7
RmtB	55.6				28.9	31.7	26.4	28.9	28.5	26.3
ArmA	30.4					26.3	26.6	20.6	28.0	24.4

TABLE 2. Results of antibiotic susceptibility test

Aminoglycoside	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	<i>P. mirabilis</i> ARS68 (pARS68)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pARS68)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pBC-E1)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pBC-KB1)
4,6-substituted deoxystreptamine antimicrobials				
Kanamycin group				
Arbekacin	>1,024	512	512	>1,024
Amikacin	>1,024	1,024	512	>1,024
Kanamycin	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
Tobramycin	1,024	256	128	512
Gentamicin group				
Gentamicin	>1,024	256	512	>1,024
Sisomicin	>1,024	512	256	>1,024
Isepamicin	>1,024	>1,024	1,024	>1,024
4,5-substituted deoxystreptamine antimicrobials				
Neomycin	512	16	0.5	1
Other aminoglycoside				
Streptomycin	4	2	2	2



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

- 第4世代セファロスポリンを分解する CMY-19 型β-ラクタマーゼの解析 -

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

近年、プラスミド媒介性 AmpC-β-ラクタマーゼ(以下 pAmpC)を産生することにより、第3世代セファロスポリンやセファマイシンに耐性を獲得した大腸菌や肺炎桿菌が臨床上問題視されている。一般に第4世代セファロスポリンであるセフェピム(CFPM)は CMY-、DHA-、FOX-型など現在までに報告されている多くの pAmpC に対し安定であり、これらを産生する菌に対してすぐれた抗菌活性を有する。しかし、我々は CMY-9-β-ラクタマーゼの構成アミノ酸を1カ所変異(I292S)させることにより、CFPM に対して分解能を増した変異型 CMY-β-ラクタマーゼ(CMY-19)を産生する臨床分離肺炎桿菌が存在することを確認した。最小発育阻止濃度(MIC)や精製酵素を用いた酵素学的解析の結果からも、CMY-19 が CMY-9 に比べ、CFPM に対する分解能が高いことが裏付けられた。また、これら CMY-9 や CMY-19 を産生する大腸菌や肺炎桿菌(計14株)よりプラスミドを抽出し、比較検討を行った結果、それらは全て同一のものであると考えられた。この事実は、異種菌間で CMY-β-ラクタマーゼをコードするプラスミドが授受されていたことを示唆している。

今後、大腸菌や肺炎桿菌などの院内感染症、術後感染症、日和見感染症の原因となる細菌が、この種の pAmpC 遺伝子を新たに獲得することにより、β-ラクタム耐性を増す危険性があり、それを防止する為に調査と監視を継続しつつ、さらに実効ある対策を講じる事が急務となっている。

研究協力者：

和知野純一、山根一和、鈴木里和、柴田尚宏、木村幸司、甲斐久美子(国立感染症研究所 細菌第二部)

A. 研究目的

近年、プラスミド媒介性 AmpC-β-ラクタマーゼ(以下 pAmpC)を産生することにより、第3世代セファロスポリンやセファマイシンに耐性を獲得した大腸菌や肺炎桿菌が国内で報告され始め、基質拡張型β-ラクタマーゼ(以下 ESBL)やメタロβ-ラクタマーゼ(以下 MBL)産生菌同様に臨床上問題視されている。

一般に CMY-、DHA-、FOX-型などの pAmpC に対して第4世代セファロスポリンであるセフェピム(CFPM)やセフピロム(CPR)は比較的安定であるため、pAmpC を産生する大腸菌や肺炎桿菌に

対して優れた抗菌活性を発揮する。

しかし、我々は CFPM に中等度耐性を示す臨床分離肺炎桿菌より、CMY-9-β-ラクタマーゼ(以下 CMY-9)の構成アミノ酸の1カ所変異(I292S)させることにより CFPM に対して分解能を増した変異型 CMY-β-ラクタマーゼ(以下 CMY-19)を同定した。そこで、本研究ではこの CMY-19 の酵素学的検討を行った。

また、本研究では、これら CMY-β-ラクタマーゼを産生する大腸菌9株及び肺炎桿菌5株(全て同一施設より分離)の遺伝学的背景の検討も併せて行った。

B. 研究方法

1. MIC(最小発育阻止濃度)については CLSI 法に準じて測定した。
2. 接合実験には broth mating 法を使用し、プ

ラスミドの抽出には Kado らの方法及び市販のプラスミド抽出キットを使用した。サザンハイブリダイゼーションは常法にて行った。

3. 大腸菌及び肺炎桿菌の PFGE 解析には XbaI を用いた。

4. 酵素学的パラメータの算出には FPLC 及び各種カラムを用いて精製した $\beta$ -ラクタマーゼを使用した。

### C. 研究結果

分離された大腸菌(9株)及び肺炎桿菌(5株)はいずれも第3世代セファロスポリン及びセファマイシンに耐性を示した(Table 1)。これらの MIC はポロン酸(AmpC- $\beta$ -ラクタマーゼ特異的阻害剤)の添加により大きく低下したため、分離された大腸菌及び肺炎桿菌は AmpC- $\beta$ -ラクタマーゼを産生しているものと考えられた。

PCR 及びその産物の塩基配列を決定したところ、肺炎桿菌 1 株と大腸菌 9 株は CMY-9- $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を、肺炎桿菌 4 株は CMY-9 の 1 アミノ酸変異体である CMY-19- $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を有することが判明した。

これら CMY- $\beta$ -ラクタマーゼは接合能を有するプラスミド上にコードされていた(Fig 1)。プラスミドプロファイルより、これら CMY- $\beta$ -ラクタマーゼをコードする接合性プラスミドは菌種を問わず同一のものと考えられた(Fig 2)。

CMY- $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の上流にはクラス 1 インテグロンが存在し、アミノグリコシド耐性を付与する *aacA1* が遺伝子カセットとして存在した(Fig 3)。

分離された肺炎桿菌 5 株の PFGE パターンは互いに異なっていたが、大腸菌 9 株に関してそのパターンは互いに酷似していた(Fig 4)。

CMY-9 と CMY-19 は 292 番目の構成アミノ酸が一つ異なる。(Fig 5)。この 1 アミノ酸の差異が $\beta$ -ラクタム薬の分解能に影響を及ぼすか否かを検証するために、それぞれの遺伝子をクロー

ニングし、組み替え体を作製した。組み替え体の各種 $\beta$ -ラクタム薬に対する MIC を Table 2 に示す。セフトジジム、セフェピムの MIC は CMY-19 を産生する組み替え体の方が CMY-9 を産生する組み替え体より高かった。セフォタキシム、セフトゾキシム、セファマイシンにおいてはそれらが逆転した。

これらの差異は酵素学的検討からも裏付けられた(Table 3)。

### D. 考察

本研究では A) 1 医療施設より分離された CMY- $\beta$ -ラクタマーゼを産生する大腸菌及び肺炎桿菌の遺伝学的関連性の検討及び B) CMY- $\beta$ -ラクタマーゼにおける 292 番目のアミノ酸が基質分解能に及ぼす影響の2つに着眼した。

A) 大腸菌及び肺炎桿菌がもつ伝達性プラスミドは同一であった。このことは、このプラスミドが大腸菌と肺炎桿菌の間で授受されていたことを示している。また、PFGE により、肺炎桿菌 5 株間の遺伝学的関連性は少ないと考えられたが、大腸菌 9 株は同一起源と考えられた。よって、本医療施設内では菌種を超えたプラスミドの水平伝播と同一起源と考えられる大腸菌による院内感染が起こったものと推測された。

B) CMY-19 と CMY-9 の間では 292 番目の構成アミノ酸が一つ異なる。この差異により各種 $\beta$ -ラクタム薬に対する分解能に違いがもたらされた。特に CMY-9 に比べて CMY-19 のセフェピム分解能が高いことは注目すべき性質といえる。CMY-19 はセフェピムなどの選択圧により CMY-9 が変異し、出現した可能性が考えられた。

### E. 結論

一般に CFPM は pAmpC には安定であると考えられているが、今回我々が解析した CMY-19 は pAmpC にも関わらず明らかに CFPM に対して分解活性を示した。最近では大腸菌やセラチア菌の

染色体性の AmpC で CFPM 分解能を有する変種が報告されている。上記のようにかつて class A 型の TEM-、SHV-ペニシリナーゼがアミノ酸置換により ESBL と化したように、pAmpC においてもアミノ酸置換により基質特異性が拡張したものが出現する事が予想されるため、今後、その動向に注目する必要がある。

なし

#### F. 健康危険情報

我が国において pAmpC の存在が 1993 年に初めて報告されて以来、散発的ではあるが pAmpC を産生する大腸菌や肺炎桿菌が分離されている。これらは ESBL や MBL と同様、臨床上重用されている多くの  $\beta$ -ラクタム薬に対して分解能を有する。今後、これら pAmpC を産生する細菌が増加し、化学療法の際に大きな障害となる事が強く懸念される。したがって、今後も pAmpC 産生株の動向を監視するとともに、抗菌薬の適正使用を含めた実効ある対策を行う必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. J. Wachino, H. Kurokawa, S. Suzuki, K. Yamane, N. Shibata, K. Kimura, Y. Ike, Y. Arakawa. Horizontal transfer of blaCMY-bearing plasmids among clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates and emergence of cefepime-hydrolyzing CMY-19. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 534-541.

##### 2. 学会発表

1. 和知野純一、黒川博史、山根一和、柴田尚宏、鈴木里和、池康嘉、荒川宜親. セフェピムを分解する CMY 型 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼの解析. 日本細菌学会. 2005. 東京.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録、その他

## FIGURE LEGENDS

**FIG. 1.** Plasmid profiles and Southern hybridization. (A) plasmid profiles of parent strains and their tranconjugants. (B) hybridization with the probe specific for CMY-1/MOX-1-type  $\beta$ -lactamase gene. Lanes: M, HindIII-digested DNA marker; 1, *K. pneumoniae* HKY209; 2, *E. coli* CSH-2/pK209; 3, *K. pneumoniae* HKY327; 4, *E. coli* CSH-2/pK327; 5, *K. pneumoniae* HKY363; 6, *E. coli* CSH-2/pK363; 7, *K. pneumoniae* HKY466; 8, *E. coli* CSH-2/pK466; 9, *K. pneumoniae* HKY474; 10, *E. coli* CSH-2/pK474; 11, *E. coli* HKY154; 12, *E. coli* CSH-2/pE154; 13, *E. coli* HKYM68; and 14, *E. coli* CSH-2/pEM68. Plasmids pK209, pK327, pK363, pK466 and pK474 were harbored by *K. pneumoniae* strains HKY209, HKY327, HKY363, HKY466 and HKY474, respectively. Plasmids pE154, pE191, pE200, pE215, pE224, pE297, pE315, pE334 and pEM68 were harbored by *E. coli* strains HKY154, HKY191, HKY200, HKY215, HKY224, HKY297, HKY315, HKY334 and HKYM68, respectively. *E. coli* CSH-2 (*metB* F<sup>-</sup> RIF<sup>r</sup> NAL<sup>r</sup>) was used as a recipient strain in the conjugation study.

**FIG. 2** Restriction enzyme digested patterns of plasmids and Southern hybridization. (A) SacI-digested plasmid DNAs prepared from the representative transconjugants. (B) Hybridization patterns with the probe specific for CMY-1/MOX-1-type  $\beta$ -lactamase gene. Lanes: M, HindIII-digested DNA marker; 1, *E. coli* CSH-2/pK209; 2, *E. coli* CSH-2/pK327; 3, *E. coli* CSH-2/pK363; 4, *E. coli* CSH-2/pK466; 5, *E. coli* CSH-2/pK474; 6, *E. coli* CSH-2/pE154; and 7, *E. coli* CSH-2/pEM68. Originations of each plasmid are the same as described in the footnote to Fig. 1.

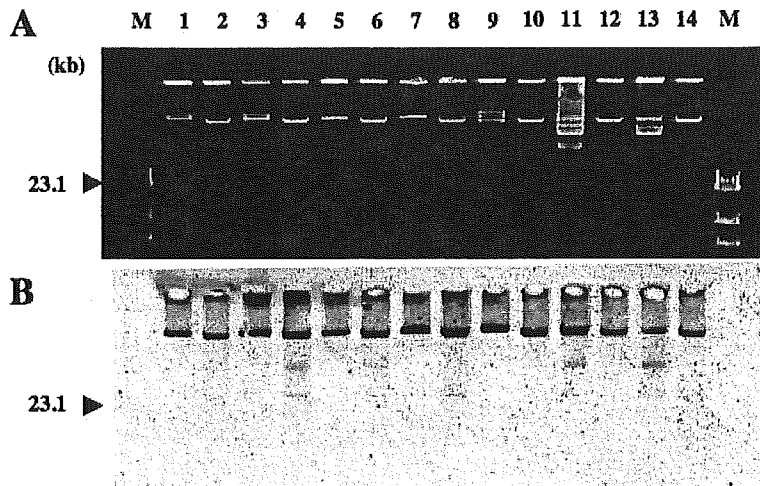
**FIG. 3.** Gene organization around *bla*<sub>CMY</sub> genes. The *bla*<sub>CMY</sub> gene on the conjugative plasmid found in the *K. pneumoniae* and *E. coli* clinical isolates located just downstream of the *orf513* as it was found in our previous study on a CMY-9 producing *E. coli* HKHM68 (12). Open circle represents the position of the 59-base element, and CS indicates conserved segment of a class 1 integron. *orf513* is speculated to encode a putative transposase, and various antimicrobial resistance genes tend to be integrated just downstream of *orf513*.

**FIG. 4.** PFGE analysis of *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates. (A) Lanes: M, PFGE marker; 2, *K. pneumoniae* HKY209; 3, *K. pneumoniae* HKY327; 4, *K. pneumoniae* HKY363; 5, *K. pneumoniae* HKY466; 6, *K. pneumoniae* HKY474. (B) Lanes: M, PFGE marker; A, *E. coli* HKY154; B, *E. coli* HKY191; C, *E. coli* HKY200; D, *E. coli* HKY215; E, *E. coli* HKY224; F,

*E. coli* HKY297; G, *E. coli* HKY315; H, *E. coli* HKY334; and I, *E. coli* HKYM68. *K. pneumoniae* strains HKY209, HKY327, HKY363, HKY466, HKY474, and *E. coli* strains HKY154, HKY191, HKY200, HKY215, HKY224, HKY297, HKY315, HKY334 are all resistant to both cephalosporins and cephamycins and they were isolated clinically in Yamaguchi Prefecture, Japan, between 1995 and 1997. *E. coli* strain HKYM68 produces CMY-9 and shows resistance to imipenem, as well as to cephalosporins and cephamycins (12).

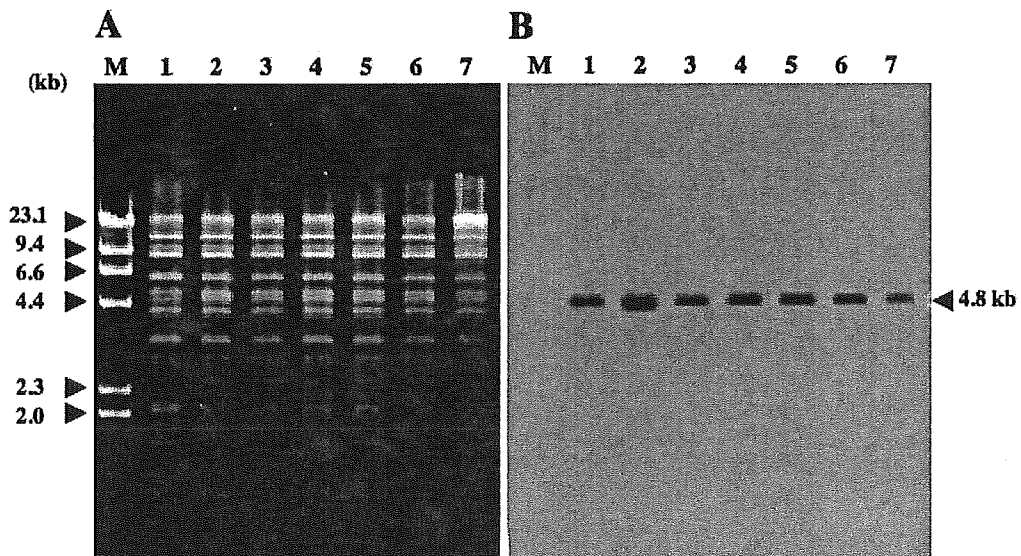
**FIG. 5.** Alignments of amino acid residues near the H-10 helix. A partial amino acid alignment of CMY-9 (12), CMY-19 (this study), CMY-11 (21), FOX-1 (15), AmpC of *E. cloacae* Ear1 and Ear2 (5), AmpC of *E. cloacae* P99 and HD (6), AmpC of *E. coli* K-12 and HKY28 (13), AmpC of *S. marcescens* S3 and HD (22). Square boxes show the amino acid substitutions or deletions that are predicted to affect cefepime hydrolyzing activity. The conserved motif KTG was underlined. Dashes (-) indicate deletions of amino acid residues. CMY-11 and FOX-type enzymes have a serine residue at the amino acid position 292, but about their property against cefepime was not described in the literature. The numbering of amino acid residues followed that for the mature CMY-1 reported by Bauernfeind et al, (7).

Fig 1



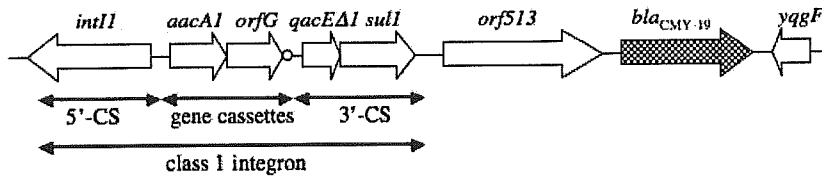
Wachino et al.

Fig 2



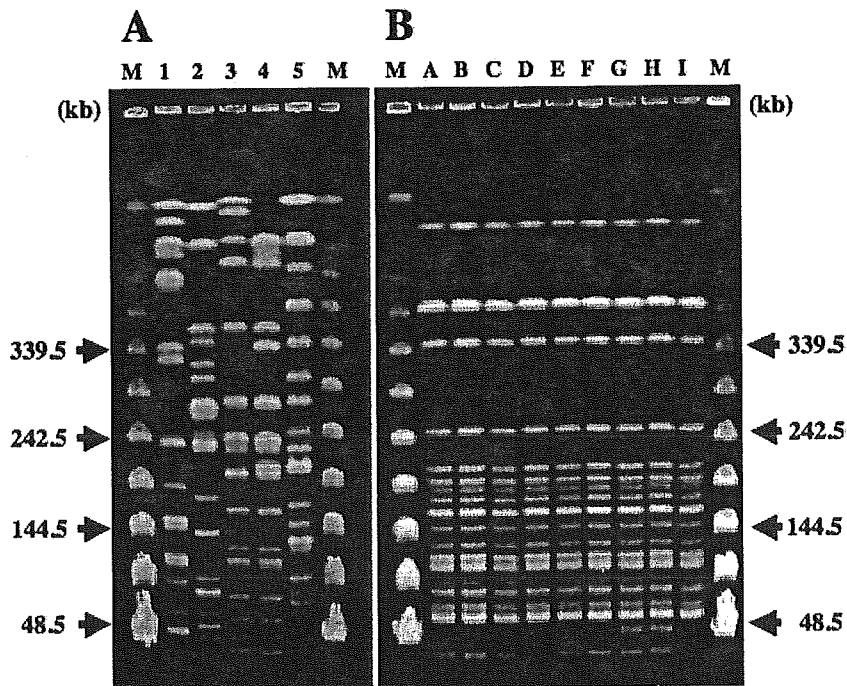
Wachino et al.

Fig 3



Wachino et al.

Fig 4



Wachino et al.

Fig 5

292

CMY-19 (*K. pneumoniae* HKY466) YPVTEQTL LAGNSAKV[S]LEAN---PTAAPRESGSQVLFNKTGSTNGFGAYVAFVPARGIG  
CMY-9 (*K. pneumoniae* HKY209) YPVTEQTL LAGNSAKVILEAN---PTAAPRESGSQVLFNKTGSTNGFGAYVAFVPARGIG  
CMY-11 (*E. coli* K983802) YPVTEQTL LAGNSAKVSLEAN---PTAAPRESGSQVLFNKTGSTNGFGAYVAFVPARGIG  
AmpC (*E. aerogenes* Ear1) WPVSPEVLINGSDNKVALAATPVTAVKPPAPPVKASWVHKTGSTGGFGSYVAFIPQDLG  
AmpC (*E. aerogenes* Ear2) WPVSPEVLINGSDNKVAPAATPVTAVKPPAPPVKASWVHKTGSTGGFGSYVAFIPQDLG  
AmpC (*E. cloacae* P99) LDAQANTVVEGSDSKVAL[APL]PVAEVNPPAPPVKASWVHKTGSTGGFGSYVAFIPEKQIG  
AmpC (*E. cloacae* CHE) LDAQANTVVEGSD-----PLPVVEVNPPAPPVKASWVHKTGSTGGFGSYVAFIPEKQIG  
AmpC (*E. coli* K-12) WPVNPDSIINGSD[NKIAL]AARPVKAITPPTPAVRASWVHKTGATGGFGSYVAFIPEKELG  
AmpC (*E. coli* HKY28) WPVNPDIIN---NKIALAARPVKIPITPPTPAVRASWVHKTGATGGFGSYVAFIPEKELG  
AmpC (*S. marcescens* S3) LDAEL SRLIE[GNN]AGMI[MNGT]PATAITPPQPELRAGWYNKTGSTGGFSTYAVFIPAKNIA  
AmpC (*S. marcescens* HD) LDAEL SRLIEGNNAGMI----PATAITPPQPELRAGWYNKTGSTGGFSTYAVFIPAKNIA

H-10 helix

Wachino et al.





TABLE 2. MICs of  $\beta$ -lactams for CMY-9 producing and CMY-19 producing strains

$\beta$ -Lactam	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )											
	Parental strain				Transconjugant				Transformant			
	<i>K. pneumoniae</i> HKY209 CMY-9	<i>K. pneumoniae</i> HKY466 CMY-19	<i>E. coli</i> CSH-2 (pK209) CMY-9	<i>E. coli</i> CSH-2 (pK466) CMY-19	<i>E. coli</i> CSH-2 (pK466) CMY-19	<i>E. coli</i> CSH-2 (pK466) CMY-19	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pBC-CMY-9) CMY-9	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pBC-CMY-9) CMY-9	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pBC-CMY-19) CMY-19	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pBC-CMY-19) CMY-19	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pBCSK+)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pBCSK+)
Ampicillin	128	>128	64	>128	4	>128	4	64	>128	2	2	2
Piperacillin	32	128	4	32	1	32	1	8	64	0.5	0.5	0.5
Piperacillin+TAZ <sup>a</sup>	16	64	2	16	1	16	1	4	32	0.5	0.5	0.5
Cephalothin	>128	>128	>128	>128	4	>128	4	>128	>128	2	2	2
Cephaloridine	128	>128	64	>128	2	>128	2	64	128	2	2	2
Ceftizoxime	64	8	32	8	<0.06	8	<0.06	64	16	<0.06	<0.06	<0.06
Ceftazidime	>128	>128	64	>128	0.13	>128	0.13	64	>128	<0.06	<0.06	<0.06
Ceftazidime+APB <sup>b</sup>	1	16	0.25	8	0.13	8	0.13	0.5	8	<0.06	<0.06	<0.06
Cefotaxime	>128	64	128	64	<0.06	64	<0.06	>128	128	<0.06	<0.06	<0.06
Cefotaxime+APB <sup>b</sup>	2	0.5	0.5	0.25	<0.06	0.25	<0.06	2	1	<0.06	<0.06	<0.06
Cefpirome	8	32	4	8	<0.06	8	<0.06	8	16	<0.06	<0.06	<0.06
Cefepime	0.25	4	<0.06	2	<0.06	2	<0.06	0.13	4	<0.06	<0.06	<0.06
Cefoxitin	>128	>128	>128	64	2	64	2	>128	128	2	2	2
Cefmetazole	>128	64	128	16	0.5	16	0.5	128	32	0.5	0.5	0.5
Cefiniox	>128	64	128	16	0.5	16	0.5	128	32	0.5	0.5	0.5
Moxalactam	32	16	8	4	<0.06	4	<0.06	8	8	<0.06	<0.06	<0.06
Aztreonam	16	16	4	8	<0.06	8	<0.06	4	16	<0.06	<0.06	<0.06
Imipenem	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.13	0.13	0.13
Meropenem	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06	<0.06

<sup>a</sup>Tazobactam was used at a concentration of 4  $\mu\text{g/ml}$ .

<sup>b</sup>3-aminophenyl boronic acid was used at a concentration of 300  $\mu\text{g/ml}$ .

TABLE 3. Kinetic parameters of CMY-9 and CMY-19

Substrate	CMY-9			CMY-19		
	$K_m$ or $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ (s)	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ or $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ (s)	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Ampicillin	$91 \pm 28$	$1.0 \pm 0.1$	$1.1 \times 10^4$	$16 \pm 1$	$0.35 \pm 0.01$	$2.2 \times 10^4$
Piperacillin	$97 \pm 21$	$0.14 \pm 0.01$	$1.4 \times 10^3$	$8.9 \pm 0.5$	$0.031 \pm 0.001$	$3.5 \times 10^3$
Cephalothin	$120 \pm 10$	$630 \pm 10$	$5.3 \times 10^6$	$230 \pm 10$	$380 \pm 10$	$1.7 \times 10^6$
Cephaloridine	$1200 \pm 100$	$99 \pm 2$	$8.3 \times 10^4$	$1500 \pm 100$	$240 \pm 10$	$1.6 \times 10^5$
Ceftizoxime	$5.5 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.1$	$2.4 \times 10^5$	$11 \pm 1$	$0.71 \pm 0.03$	$6.5 \times 10^4$
Ceftazidime	$560 \pm 110$	$1.8 \pm 0.3$	$3.2 \times 10^3$	$3.7 \pm 0.1$	$0.085 \pm 0.002$	$2.3 \times 10^4$
Cefotaxime	$0.28 \pm 0.01$	$0.27 \pm 0.01$	$9.6 \times 10^5$	$31 \pm 2$	$0.33 \pm 0.01$	$1.1 \times 10^4$
Cefpirome	$390 \pm 50$	$3.6 \pm 0.3$	$9.2 \times 10^3$	$25 \pm 2$	$0.58 \pm 0.02$	$2.3 \times 10^4$
Cefepime	$950 \pm 50$	NH <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>	$630 \pm 170$	$1.8 \pm 0.4$	$2.9 \times 10^3$
Cefoxitin	$60 \pm 2$	$50 \pm 1$	$8.3 \times 10^5$	$0.90 \pm 0.03$	$0.12 \pm 0.01$	$1.3 \times 10^5$
Cefmetazole	$5.1 \pm 0.2$	$1.7 \pm 0.1$	$3.3 \times 10^5$	$0.26 \pm 0.01$	$0.045 \pm 0.001$	$1.7 \times 10^5$
Moxalactam	$0.22 \pm 0.01$	NH	ND	$0.40 \pm 0.03$	NH	ND
Imipenem	$4.6 \pm 0.3$	NH	ND	$4.3 \pm 0.1$	NH	ND

NH<sup>a</sup>: not hydrolyzedND<sup>b</sup>: not determined

## 臨床分離メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の抗菌剤感受性

主任研究者 池 康嘉<sup>1,2</sup>

研究協力者 荒川 宜親<sup>3</sup>、長沢 光章<sup>4</sup>

谷本 弘一<sup>2</sup>、富田 治芳<sup>1</sup>、野村 隆浩<sup>1</sup>、藤本 修平<sup>1</sup>

群馬大学大学院医学系研究科 細菌感染制御学<sup>1</sup>、同薬剤耐性菌実験施設<sup>2</sup>

国立感染症研究所 細菌第二部<sup>3</sup>、防衛医科大学校病院 検査部<sup>4</sup>

**研究要旨** 2004年に全国95病院より収集したMRSA 2231株より無作為に1096株を選び、MRSAの感受性率が高いことが知られているバンコマイシン、テイコプラニン、アルベカシンについて発育最小阻止濃度(MIC)測定を行った。また、多くのMRSAが耐性である。その結果、バンコマイシン、テイコプラニンに対する耐性菌は見いだされず、アルベカシンについても低度耐性株(8  $\mu$ g/ml)が1%存在したもののそれ以上の耐性菌は存在しなかった。

### A. 目的

医療機関、特に高度先進医療が実施される医療施設において、多剤薬剤耐性菌による院内感染症が大きな問題となっている。中でもグラム陰性菌の多剤 $\beta$ -ラクタム剤耐性菌・グラム陽性菌のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)・バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)は、患者の状態により、それらの感染症に対する有効な治療薬が存在しないことがおこり得るために問題となる。MRSAは臨床分離される黄色ブドウ球菌の6割強を占め、多くの $\beta$ -ラクタム剤、アミノ糖、ニューキノロン剤に対して耐性を示すため、易感染者に対して強い病原性を示し院内感染の起原菌として大きな問題となってきた。現在、MRSA感染症に対してバンコマイシン、テイコプラニン、アルベカシンが使

用されているがMRSAは元来、外部から遺伝子を取り込む能力が高く、それら薬剤に対する耐性菌の出現が危惧されてきた。実際、アメリカ合衆国ではバンコマイシンに耐性のMRSA(VRSA)の出現が報告されているし(1)、アルベカシンに対する高度耐性株は我が国において非常に稀な例ではあるが報告されている(2)。そこで我々は臨床現場に現れるMRSAの感受性を調べ、これら薬剤に対する感受性が低下していないか監視し、耐性菌が見いだされた場合には遺伝学的研究を行う目的でMRSAを全国規模で収集し、各薬剤に対する最小発育阻止濃度を調べたのでその結果を報告する。

### B. 材料と方法