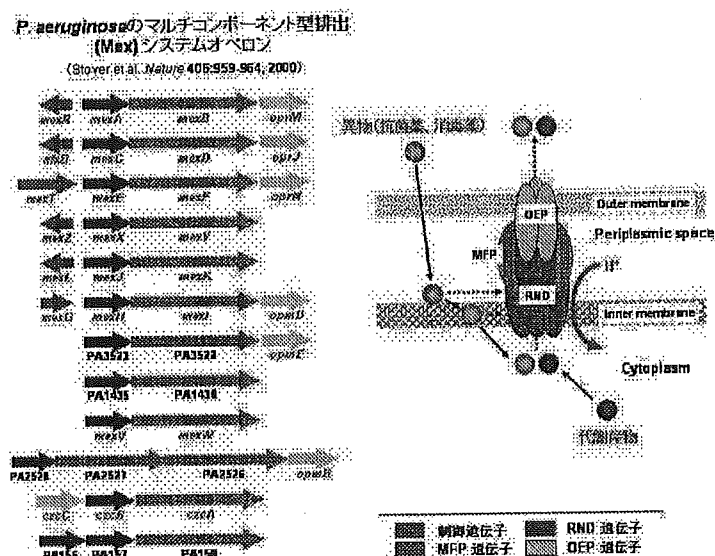


緑膿菌の多剤耐性に働く抗菌薬排出システムの性状と発現検出法

京都薬大・微生物 後藤直正



生育環境下に存在する異物や代謝産物を細胞内から外にエネルギー依存的に輸送（排出）する異物排出システムは細菌も含めて生物界に広く分布している。細菌の排出システムは、エネルギー源や構造から幾つかのファミリーに分けられ、それらが抗菌薬、消毒薬などに対する耐性に働いているという情報は蓄積されてきた。

私どもは抗菌薬耐性菌として临床上重要な位置を占める緑膿菌の排出システム、特に内膜コンポーネント（RND）、外膜コンポーネント（OEP）およびペリプラスムコンポーネント（MFP）から形成されるマルチコンポーネント型排出システム（Mex システム）の研究を行ってきた。緑膿菌の染色体上には上図に示すように 12 種類の Mex システムのホモログがコードされている。私どもは、このうち幾つかの排出システムをクローン化し、その性状解析から、本排出システムが緑膿菌の抗菌薬耐性、さらには病原性発現に働いていることを示してきた。しかし、なぜ、緑膿菌の染色体上には 12 種類ものマルチコンポーネント型排出システムがコードされているのか疑問は尽きない。本演題では、緑膿菌の排出システムについて、Mex システムの構造と発現、抗菌薬耐性や病原性への寄与および発現検出法について概説する。

成人・耳鼻科感染症由来の検体を用いた PCR による原因菌の迅速検索と耐性遺伝子の解析

北里大学北里生命科学研究所，感染情報学研究室

生方 公子，諸角美由紀，長谷川恵子，小林 玲子

【目的】

小児での耐性菌増加に伴い，成人例においても耐性菌による肺炎や急性中耳炎，あるいは急性副鼻腔炎などといった感染症例において，耐性菌による発症例が増加しているといわれる。しかし，外来診療において遭遇するこれらの感染症例に対しては，抗菌薬は empiric に処方されているのが現状である。患者に対する治療のみならず，耐性菌の増加を抑えるためにも，また医療経済上も，初期診断において原因菌を明確にし，最も適切な抗菌薬を使用することが必要である。そのような視点から，本年度においては，成人由来の検査材料に対して，小児の検査材料を用いて昨年度に確立した 6 菌種の病原微生物に対する PCR を応用し，実際の培養成績との関係について検証することを目的とした。

【方法】

耳鼻咽喉科の医師より送付を受けた検査材料は，急性中耳炎が 38 例，慢性中耳炎が 12 例，急性副鼻腔炎が 107 例，慢性副鼻腔炎が 20 例であった。その他に扁桃炎例が 14 例であった。それらの検体は到着後 1.5ml の broth に混釈し，5000rpm，5 分の遠心後，上清を捨て去り沈渣部分を 100 μ l にして，その 5 μ l を 30 μ l の溶菌へ加え，溶菌操作を実施した。次いで 8 連チューブに調整した 6 菌種の反応液中に溶菌液を 2 μ l ずつ加え，conventional PCR(C-PCR)，あるいはモレキュラー・ビーコンを用いる real-time PCR を実施した。所要時間は前者が約 2.6 時間，後者が 3 時間である。残りの沈渣は 10 μ l ずつのルーチンの細菌培養と炎症所見の観察を行った。

【結果と考察】

急性中耳炎例の 38% から肺炎球菌，次いでインフルエンザ菌が 11%，A 群レンサ球菌，モラキセラ菌，MSSA が各 8% ずつ分離されたが，PCR で迅速検索を目的としている菌は PCR ですべて陽性であった。急性副鼻腔炎例からは肺炎球菌が 26%，インフルエンザ菌が 18% と多く，その他にはモラキセラ菌が 10% であった。特に，モレキュラー・ビーコンを用いる real-time PCR は菌量の予測が可能であり，利用価値が高いと判断される。

また，分離された肺炎球菌とインフルエンザ菌に対して耐性遺伝子解析を実施したが，肺炎球菌の各 24% が PRSP と PSSP，残りは PISP であった。インフルエンザ菌は 58% が 2 箇所に変異を持つ BLNAR であったことが注目された。

このような耐性菌の急速な増加を抑えるには，起炎菌を確定した後に抗菌薬を選択するというコンセンサスの確立が急務である。

平成16年度 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

「新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び

迅速・簡便検出法に関する研究(H15-新興-9)」

班会議抄録

日時：2005年3月4日(金)13:00 P.M.

場所：東京都新宿区戸山一丁目23番1号

国立感染症研究所 共用第2会議室

プログラム

1. サルモネラの多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学
山本 友子¹、研究協力者:内村 真佐子²、依田 清江² (千葉大学大学院薬学研究院¹、
千葉県衛生研究所²)
2. プラスミドにコードされた AmpC β -ラクタマーゼ産生遺伝子の解析
井上 松久、研究協力者:岡本 了一、中野 竜一 (北里大学医学部微生物)
3. 緑膿菌の多剤耐性に機能する RND 型排出システムの性状解析と発現の簡便検出法の開発
後藤 直正、研究協力者:尾崎 徹、門野 愛美 (京都薬科大学・微生物)
4. カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究:ダンシル基とチオール基を有する蛍光試薬の
クラス A および B β -ラクタマーゼに対する蛍光特性と阻害活性
黒崎 博雅¹、協力研究者:山口 佳宏¹、大岡 建太郎¹、和知野 純一²、柴田 尚弘²、
荒川 宜親² (熊本大学大学院医学薬学研究部構造機能物理化学分野¹、国立感染症
研究所細菌第二部²)
5. 成人の肺炎および耳鼻咽喉科感染症からの検体を用いた原因菌の迅速検索と耐性遺伝子
解析
生方 公子 (北里大学北里生命科学研究所 感染情報学研究室)
6. 臨床材料から分離された ESBL 産生および Shiga toxin を産生する *Escherichia coli* に関する
検討
山口 恵三、研究協力者:石井 良和 (東邦大学医学部微生物学講座)
7. CTX-M-型 β -ラクタマーゼの分子型別、クラス C β -ラクタマーゼの簡易識別法、および
16S rRNA メチレーゼ産生株の分離状況
荒川 宜親、研究協力者:柴田 尚宏、和知野 純一、八木 哲也、山根 一和、
鈴木 里和 (国立感染症研究所 細菌第二部)
8. リアルタイム PCR を利用したニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフス A 菌の *gyrA* 変異の
迅速スクリーニング法の検討
渡邊 治雄、研究協力者:廣瀬 健二 (国立感染症研究所細菌第一部)
9. 黄色ブドウ球菌 PBP のイミペネムに対する反応性
和田 昭仁 (国立感染症研究所 細菌第一部)
10. *E. faecalis* VanB VRE の高頻度伝達性バンコマイシン耐性プラスミドの解析
池 康嘉^{1,2}、研究協力者:富田 治芳¹、鄭 波¹、井上 貴子¹、野村 隆浩¹、谷本 弘一²、
藤本 修平¹、麻 興華¹、宮本 真美子¹
(群馬大学大学院医学系研究科細菌感染制御学¹、同薬剤耐性菌実験施設²)

分担研究課題：サルモネラが多剤耐性菌のレファレンスと分子疫学

分担研究者：山本友子（千葉大学大学院薬学研究院）

研究協力者：内村真佐子・依田清江（千葉県衛生研究所）

1990年以降、国内外において多剤耐性サルモネラは急激な増加をみせ、サルモネラ食中毒発症時の治療を困難にしている。昨年度の研究において、1999年から2002年に千葉県下で発生した食中毒散発事例より分離された *Salmonella enterica* serovar Typhimurium を対象に疫学的解析を行った結果、62%(23株)が多剤耐性(Ap,Sm,Su,Tc,Cm)であった。これは国内の多剤耐性サルモネラ検出状況と同様であることから、本研究のように規模を縮小して詳細な分子疫学的研究を行うことにより、全国規模のサルモネラ耐性菌増加の分子基盤を推定することが可能であると考えられた。

昨年度行った β -lactamaseのタイピングにより、PSE-1型が65%(15株)、22%(5株)がOXA-1型、13%(3株)がその他をコードしていることが明らかとなった。さらにファージ型別、遺伝子解析を行い、PSE-1型耐性菌はすべてDT104であることが明らかとなった。今年度はOXA-1型耐性菌について遺伝子解析を行い以下のことを明らかにした。

OXA-1型耐性菌はいずれもAp,Sm,Su,Tc,Cm,Km,Tpの7剤耐性菌であり、耐性遺伝子はすべて同一と推定できる150 kbpのInc-FI伝達性プラスミドにコードされていた。class 1インテグロンの存在を推定し、PCRおよびDNA sequencingにより検討した結果、プラスミドには異なる2種のclass 1インテグロン、In-t1(*aadB-catB*)とIn-t2(*oxa1, aadA1*)が存在することが明らかとなった。このプラスミドは1998年に発生したサルモネラ食中毒の原因食由来菌(1株)と1999年、2000年に発生した食中毒患者由来菌(4株)から分離されたことから、プロトタイプのIncFIプラスミドが2種のclass 1インテグロンを獲得して進化し、サルモネラ多剤耐性菌の増加の一因となっていると考えられる。

一方、多剤耐性サルモネラの中で最も分離頻度の高いDT104は、Ap(PSE-1), Sm,Su,Tc,Cm耐性遺伝子を *Salmonella* Genomic Island 1(SGI1)内に有している。我々は以前に1975年の臨床分離大腸菌が保有するプラスミド上にPSE-1を含むトランスポゾンTn2610を見出し報告している。今回は、SGI1の耐性遺伝子領域のプロトタイプを見出し、SGI1構築のメカニズムを明らかにするために、Tn2610の全塩基配列(23883bp)を決定し詳細な構造解析を行った。その結果、Tn2610とSGI1は共通の祖先を持つと考えられた。

プラスミドにコードされた AmpC β -ラクタマーゼ産生遺伝子の解析

北里大学医学部微生物
井上松久（分担研究者）
岡本了一（研究協力者）
中野竜一（研究協力者）

大腸菌や肺炎桿菌のセフェム系薬高度耐性化のメカニズムの一つとして、プラスミドにコードされた AmpC β -ラクタマーゼがある。プラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼ産生菌は、ヨーロッパやアメリカからの報告例が多かったが、ここ数年わが国においても分離されるようになった。プラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼ産生遺伝子は、*C. freundii*, *E. cloacae*, *M. morgani*, *Aeromonas* 属などの染色体上の *ampC* 遺伝子はその由来とされるが、どのような過程を経て染色体上の遺伝子がプラスミド化するかについてはわかっていない。わが国では現在のところ *C. freundii* 由来の AmpC β -ラクタマーゼが報告されている。そこで、今年度は私共の研究室で検出した CFE-1 および CMY-4 をコードするプラスミドの解析を行い、AmpC 多量産生機構の解析とプラスミド化の過程について考察した。

1) プラスミド pKU601 がコードする CFE-1 は、その *ampR-ampC* が *C. freundii* GC3 と 99% と非常に高い相同性を示し、かつ *ampC* の上流には *C. freundii* と同様に fumarate operon *frdA*, *B*, *C*, *D* が確認された。CFE-1 は産生調節遺伝子である *ampR* を保有しており、その塩基配列から Asp135 が Ala に変化した変異 *ampR* が CFE-1 多量産生の原因であることが明らかになった。

さらに、*ampC* のすぐ下流と *ampC* の上流にある *frdA* にはトランスポゾン IS26 が完全な形で挿入されていることが分かった。二つの IS26 は同一方向を向いていたが、何れも DNA の転移に関するトランスポザーゼ *tnpA* を持っていた。したがって、これら IS26 が *C. freundii* 染色体上の *ampC* 遺伝子がプラスミド化する過程で大きく関与したことが推測された。

2) プラスミド pKU631 がコードする CMY-4 は、*ampC* が *C. freundii* のそれと 95% の相同性を持ち、しかも CFE-1 に認められたような *ampR* が *ampC* の上流には認められず、代わって IS*Ecp1* の挿入が確認された。CMY-4 は調節遺伝子 *ampR* を持たないにもかかわらず AmpC を多量産生することから、その原因を究明したところ、挿入された IS*Ecp1* 内の強力なプロモータにより AmpC が転写されていることが明らかになった。

以上のごとくプラスミドにコードされた AmpC β -ラクタマーゼについて解析を行った結果、細菌の染色体上の遺伝子がプラスミド化する過程には、AmpC に安定な抗菌薬の使用に関連して挿入配列が大きく関与している可能性が強く示唆された。さらに、これら挿入配列はその下流の *ampC* の発現にも大きく関与していることも明らかになった。今回の解析では、これら挿入配列の働きによって *ampC* 遺伝子が転移する現象を証明することはできなかったが、今後の課題として証明する必要がある。

緑膿菌の多剤耐性に機能する RND 型排出システムの性状解析と発現の簡便検出法の開発

京都薬科大学・微生物学教室 後藤直正、尾崎 徹、門野愛美

緑膿菌の染色体には、抗菌薬や消毒薬などの異物や細胞内代謝産物の排出に働いている12種類の RND 型排出システムがコードされている。本年度研究では、1) RND 型排出システムの新しい機能、2) 染色体上に12種類もの排出システムがコードされている意義、さらには 3) キノロン耐性緑膿菌での排出システム発現の簡便検出法の開発を行った。

1) RND 型排出システムの新しい機能

緑膿菌の排出システムの一つである MexCD-OprJ の高発現株で β -lactamase の誘導産生の低下とそれに伴う carbapenem 系抗菌薬に対する高感受性化が起こる。この β -lactamase の誘導産生の低下の原因は、 β -lactam 系抗菌薬の作用によって細胞内に蓄積し、染色体性 AmpC β -lactamase の産生を誘導するムロペプチド GlcNAc-anhMurNAc peptides が MexCD-OprJ により排出され、これが原因で β -lactamase の誘導産生の低下が引き起こされていることを明らかにした。

2) 染色体上に12種類もの排出システムがコードされている意義

私たちはすでに緑膿菌の増殖フェーズに伴った12種類の排出システムの発現を定量的 RT-PCR や特異抗体を用いたウェスタンイムノブロットによって調べたところ、多くの排出システムの発現はウェスタンイムノブロットでは検出できず、またそのレベルでは抗菌薬耐性には寄与しないことを明らかにした。これは抗菌薬耐性に機能することが知られた排出システム (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY-OprM, MexEF-OprN) 以外の排出システムは抗菌薬排出よりも別の機能を持っていることを示唆する結果であった。そこで、実験室株である PAO1 株から12種類の排出システムを欠失した株を相同的組換えにより作成し、それらの変異株での病原因子産生を調べた。その結果、欠失する排出システムによりエラスターゼとアルカリプロテアーゼの産生性および運動性の減少や経鼻肺感染モデルでのマウス致死効果の低下が観察された。これらの結果は、発現の低い排出システムは緑膿菌の抗菌薬耐性に寄与するのが本来の機能ではなく、生育環境に応じた病原因子産生に機能していることを示している。

3) キノロン耐性緑膿菌での排出システム発現の簡便検出法の開発

市販のキノロンディスクと新たに作成したインヒビターディスクを用いることにより、キノロン耐性緑膿菌での排出システム発現を簡便に検出する方法を考案した。この方法の有用性を臨床分離のキノロン耐性株で調べたところ、定量的 RT-PCR や特異抗体を用いたウェスタンイムノブロットによって調べられた排出システムの発現とディスク法での結果が一致した。これらのことより、ディスク法の有用性が確認された。

カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究：

ダンシル基とチオール基を有する蛍光試薬のクラス A および B β -ラクタマーゼに対する蛍光特性と阻害活性

分担研究者：黒崎博雅¹

協力研究者：山口佳宏¹、大岡建太郎¹、和知野純一²、柴田尚弘²、荒川宜親²

熊本大学大学院医学薬学研究部構造機能物理化学分野¹、国立感染症研究所細菌第二部²

抗生物質に耐性を示す細菌の出現は薬物治療を困難にし、感染症治療を行う上で大きな脅威となっている。その耐性機構の1つに β -lactamase があげられる。クラス B に属する metallo- β -lactamases (MBLs)は活性部位に亜鉛を持ち、ほとんどの抗生物質の β -ラクタム剤を不活化する。1990年代よりわが国においてクラス B MBL の IMP-1 による院内感染が報告され、これらの菌に対する検出法の開発が急務である。

そこで当研究室は臨床検査室などで迅速かつ簡便に測定が可能であると考えられる蛍光プローブによる MBL 産生菌の検出法の開発を行っている。以前我々は DansylCnSH ($n = 2\sim 6$, Figure 1)とクラス B MBL (IMP-1)との相互作用を蛍光スペクトルで検討した。その結果、DansylCnSH は IMP-1 共存下蛍光強度の増加が観測され、さらに 1:1 で結合することを明らかにした($K_d = 67\sim 975$ nM)。

そこで本蛍光試薬のクラス A serine- β -lactamase および IMP-1 以外のクラス B MBL に対する蛍光特性ならびに阻害活性について検討した。

【方法】 1 μ M の DansylCnSH 溶液に培養・精製したクラス A GES-3 またはクラス B Bla-b 酵素溶液を適宜加えていき、励起波長 340 nm で蛍光スペクトルを測定した。

【結果・考察】 蛍光スペクトルの測定により、クラス A の GES-3 では蛍光スペクトル変化は見られず、蛍光が観測されなかった。一方、クラス B Bla-b においては GES-3 とは異なり蛍光強度の上昇が観測された(Figure 2)。蛍光スペクトルから求めた解離定数 K_d は 1.9~2.3 μ M で DansylC5SH が最も強く Bla-b に結合することがわかった。

Figure 2. Fluorescence emission spectra (excitation 340 nm) of 1 μ M DansylC4SH with increasing concentration of Bla-b ranging from 0 to 10 μ M.

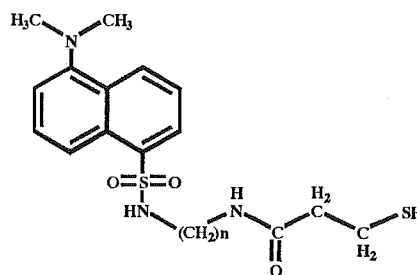
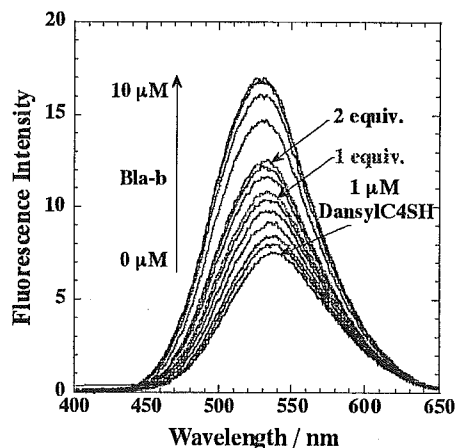


Figure 1. DansylCnSH ($n = 2\sim 6$)



また、IND-1 の結晶化並びに X 線結晶構造解析に成功したのでその結果についても報告する。

成人の肺炎および耳鼻咽喉科感染症からの検体を用いた原因菌の迅速検索と 耐性遺伝子解析

北里大学北里生命科学研究所，感染情報学研究室 生方 公子

【目的】

成人例においても耐性菌による肺炎や急性中耳炎，あるいは急性副鼻腔炎などといった感染症例において，耐性菌による発症例が増加している。しかし，外来診療において遭遇するこれらの感染症例に対しては，抗菌薬は empiric に処方されているのが現状である。患者に対する治療のみならず，耐性菌の増加を抑えるためにも，また医療経済上も，初期診断において原因菌を明確にし，最も適切な抗菌薬を使用することが必要である。そのような視点から，本年度においては，成人由来の検査材料に対して，6菌種の病原微生物に対する PCR，およびモレキュラー・ビーコンを用いる real-time PCR を応用し，実際の培養成績と比較検討した。

【方法】

耳鼻咽喉科の医師より送付を受けた検査材料は，急性中耳炎が 45 例，慢性中耳炎が 12 例，急性副鼻腔炎が 125 例，慢性副鼻腔炎が 20 例であった。それらの検体は到着後 1.5ml の broth に混釈し，5000rpm，5 分の遠心後，上清を捨て去り沈渣部分を 100 μ l にしてサンプル液とした。サンプル DNA は EXTRAGENII を用いて抽出した。PCR 用 8 連チューブに調整した 6 菌種検索用の反応液中にサンプル DNA を加え，conventional PCR (C-PCR)，あるいは蛍光標識したモレキュラー・ビーコンを用いる real-time PCR を実施した。所要時間は前者が約 2.6 時間，後者が 1.5 時間である。残りの沈渣は 10 μ l ずつのルーチンの細菌培養を行った。

【結果と考察】

急性中耳炎例の 37% から肺炎球菌，次いでインフルエンザ菌が 12% 分離され，その他に A 群レンサ球菌，モラキセラ菌，MSSA なども分離された。急性副鼻腔炎例からは肺炎球菌が 26%，インフルエンザ菌が 18% と多く，その他にはモラキセラ菌が 10% であった。

肺炎例からは肺炎球菌やインフルエンザ菌のほかに，PCR による迅速検索を目的としている菌のマイコプラズマ，レジオネラ菌などが real-time PCR で陽性と判定されている。しかし，それらの症例では既に経口抗菌薬が投与されており，培養ではほとんどが陰性であった。従来 of PCR 法に較べ，real-time PCR 法は菌量の予測が可能であり，しかも特異度と省力化ができ，臨床応用への価値が高いと判断された。

また，分離された肺炎球菌とインフルエンザ菌に対して耐性遺伝子解析を PCR 法で実施したが，肺炎球菌の各 24% が PRSP と PSSP，残りは PISP であった。インフルエンザ菌は 58% が 2 箇所に変異を持つ BLNAR であったことが注目された。

このような耐性菌の急速な増加を抑えるには，起炎菌を確定し，適切な抗菌薬を使用するというコンセンサスの確立が急務である。

臨床材料から分離された ESBL 産生および Shiga toxin を産生する

*Escherichia coli*に関する検討

分担研究者 山口恵三 研究協力者 石井良和

東邦大学医学部微生物学講座

欧米では *Salmonella* あるいは *Shigella* など、いわゆる強毒菌が ESBL を産生するという報告が散見されるが、本邦では現在までこのような報告はない。2004 年 6 月、東邦大学医学部大橋病院を受診した女児より、Shiga toxin および ESBL を同時に産生する *Escherichia coli* が分離された。今回は本菌株の細菌学的性状ならびに耐性因子を明らかにすることを目的に検討を加えたので報告する。

伝染性紅斑治療目的で 2004 年 5 月 17 日より東邦大学医学部大橋病院小児科に通院中の 9 歳女児が、5 月 21 日より腹痛、軟便を認め、6 月 14 日、腹痛に加え便が水様性を呈し、排便回数も 5~6 回/日に増加したため東邦大学医学部大橋病院を再受診した。6 月 16 日に細菌検査のための便が採取された。なお、6 月 11 日に実施していた血液検査成績は WBC 7900/ μ l、CRP 0.1mg/dl であり、異常値は認めなかった。

6 月 16 日に採取された便は目視では血液の混入を認めなかったが、培養にて *E. coli* が分離された。本菌株の血清型が O26 であったため、RPLA 法にて毒素検出をしたところ VT1 陽性、VT2 陰性と判定された。そこで、本菌株が産生する病原因子を PCR 法で検出したところ、*stx1*、*eaeA* および *hlyA* が陽性となったが、*stx2* は陰性であった。薬剤感受性成績では CTX の MIC 値 $>32 \mu$ g/ml となったため NCCLS が推奨する ESBL の確認検査をディスク法にて実施した。その結果、CTX と CTX/CVA との阻止円径の差が 14mm であり、本菌株が ESBL を産生していることが強く示唆された。そこで、PCR にて ESBL の産生遺伝子を確認したところ、CTX-M-9 が属するサブグループ特異的プライマーにてシグナルが認められた。そこで、CTX-M-9 の構造遺伝子の全長を増幅するプライマーにて当該 CTX-M-型 β ラクタマーゼ遺伝子を増幅し、その塩基配列を決定したところ、本 ESBL は CTX-M-18 であった。

これまで本邦では、ESBL を産生する腸管病原性大腸菌が分離されたとの報告はなかった。しかし、今回 ESBL を産生する *E. coli* O26 が分離された。*E. coli* 157 を含め、腸管出血性大腸菌に対する抗菌薬治療の是非に関しては現在も議論の最中である。しかし、このような下痢患者が市中病院を受診した際に抗菌薬が経験的治療の目的で投与される可能性は高いと思われる。そのような場合、症状が重篤化する能性があり、今後の耐性菌サーベイランスは血清型に関しても情報収集が必要であると考えられる。

本症例に関して学術集会ならびに学術雑誌上に公表することをご同意くださった患者様およびそのご家族に感謝いたします。

CTX-M-型 β -ラクタマーゼの分子型別、クラスC β -ラクタマーゼの簡易識別法、および16S rRNAメチレーズ産生株の分離状況

国立感染症研究所 細菌第二部

柴田尚宏、和知野純一、八木哲也、山根一和、鈴木里和、荒川宜親

国内外の医療現場では、広域 β -ラクタム薬に耐性を獲得した様々な菌種が出現し、増加傾向にあり、それらによる院内感染の発生が問題となりつつある。そこで国内の医療施設で2001-2003年に分離され、感染研に遺伝子の型別の解析依頼があった腸内細菌科および *Acinetobacter* 属菌1,456株について、CTX-M-型 β -ラクタマーゼのPCRによる検出を行ない、さらに詳しい遺伝子型別を317株について行った。

その結果、CTX-M-1、CTX-M-3 およびその新しい variant である CTX-M-36 の存在が確認された。また、CTX-M-2 とともにその variant である CTX-M-15 が複数の施設で分離され、さらに、その近縁の CTX-M-35 の存在も確認された。一方、CTX-M-9 とそれに近縁の CTX-M-14 が既に複数の国内の医療施設から分離される事が判明した。

また、これまで、簡便な検出法が確立されていなかったクラスCの β -ラクタマーゼ、特にプラスミド性のCMY-型 β -ラクタマーゼなどを容易に検出、識別するために、ポロン酸化合物を用いた試験法を新たに開発した。既に遺伝子型が確認されている保存株を用いた試験では、本試験法の特異度、感度は、disk法、微量液体希釈法の双方で、十分に実用に耐えられるものと期待される。本試験法の基本原理については、既に特許申請を行い、年内には市販される計画で、準備が進められている。

一方、臨床的に有用な様々な半合成アミノグリコシドに高度の耐性を付与する、プラスミド性16S rRNAメチレーズ (RmtA, RmtB) を我々は発見し、既に報告しているが、それらの国内での分離状況を予備的に調査した。その結果、新たに、RmrA を産生する緑膿菌のみならず、RmtB を産生する、*E. coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca* などが国内に広く分布している徴候を把握した。さらに、欧州で発見されている ArmA についても、既に国内に侵入している事を新たに確認した。以上の結果から、この種のプラスミド性16S rRNAメチレーズ産生株に対する国内施設での監視を強化する必要がある。

リアルタイムPCRを利用したニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフスA菌の *gyrA* 変異の迅速スクリーニング法の検討

分担研究者 渡邊治雄

国立感染症研究所副所長

研究協力者 廣瀬健二

国立感染症研究所細菌第一部

目的 腸チフス・パラチフスは、日本を除く東アジア、東南アジア、インド亜大陸、中東、東欧、中南米、アフリカなどに蔓延し、現在もなお流行を繰り返している。腸チフス・パラチフスは、チフス菌・パラチフスA菌の感染によって起こる。治療には抗菌剤の投与が行われる。現在、ニューキノロン系抗菌剤が腸チフス・パラチフスの第一選択薬となっている。ところが、チフス菌・パラチフスA菌においては、治療の第一選択薬であるニューキノロン剤が有効でないニューキノロン低感受性菌が増加し、治療上の大きな問題となっている。腸チフス・パラチフスでは、ニューキノロン低感受性菌かどうかを治療開始前に知ることが重要である。現在はナリジクス酸の感受性を調べる試験がニューキノロン低感受性菌のスクリーニングとして利用されている。しかしながら、薬剤感受性試験は菌の培養による検査のため、約18時間検査に要する。早期に治療を開始するために、より迅速なスクリーニング法が要求されている。私たちはこの要求に応えるために、リアルタイムPCRを利用したニューキノロン低感受性チフス菌・パラチフスA菌の迅速スクリーニング法を開発したので、報告する。

方法 ニューキノロン低感受性はDNAジャイレースをコードする遺伝子 *gyrA* のある特定の部位に点変異が入るために起こる。私たちは、リアルタイムPCRを用いて *gyrA* の変異を検出する方法を開発した。検出には、非常に特異性の高い検出方法であるサイクリングプローブ法を用いた。変異が入る *gyrA* のコドン83番と87番部位の変異を検出できるサイクリングプローブを作成した。この検出方法では、変異がないDNAを用いてリアルタイムPCRを行うと蛍光の増加が見られるが、変異が入ったDNAでリアルタイムPCRを行っても蛍光は検出されない。チフス菌・パラチフスA菌は臨床から分離された株を使用した。普通寒天培地上に発育した数個のコロニーからDNAを抽出し実験に使用した。リアルタイムPCRはTakaraのSmart Cycler Systemを使用した。PCR反応は95度15秒、55度20秒、72度15秒を1サイクルとし、40サイクル反応を行った。83番用プローブはFAM、87番用プローブはROXでラベルし、2種類の蛍光プローブを1本のチューブに入れマルチプレックスPCRとして行った。この方法で83番と87番部位に変異が入っていると判断されたものは、さらに置換された塩基を特異的に検出するサイクリングプローブで83番(TCC)、87番(GAC)がどの様に置換されたかを調べた。

結果と考察 私たちが今までにニューキノロン低感受性研究でチフス菌・パラチフスA菌の *gyrA* の変異を調べた結果、83番(TCC)は TTC, TAC、87番(GAC)は TAC, AAC, GGCに変異し、変異が起こる場所は特定の部位であることを報告した。この方法ですべての変異を検出し、どの様に置換されたかを調べることができるかを変異が入った株のDNAを使用し検討した。その結果、上記の方法で(1)83番、87番の *gyrA* の変異を検出ができること、(2)83番(TCC)、87番(GAC)の置換された塩基を決めることができること、を確認できた。この方法は約1時間で結果が出るため、従来のナリジクス酸による薬剤感受性試験よりはるかに迅速に感受性を推定できる方法である。この方法は、腸チフス・パラチフスの治療という観点から大いに貢献できる方法であると思われる。

黄色ブドウ球菌 PBP のイミペネムに対する反応性

○和田昭仁 国立感染症研究所 細菌第一部

【目的】昨年度の班研究において、黄色ブドウ球菌の細胞壁合成酵素の一つである PBP1 は、MSSA においても MRSA においても、その増殖に必須であることが遺伝学的に示された。しかし、この両者のもつ PBP1 は、ともにベータラクタム剤感受性である (MRSA の持つ PBP1 も MSSA 同様、低濃度のベータラクタム剤と反応する)。遺伝学的に示された PBP1 の必須性と、PBP アッセイで観察される PBP1 のベータラクタム剤感受性を矛盾なく説明するために、未標識イミペネムと蛍光標識ペニシリンをもちいた定量 PBP アッセイをおこなった。

【対象と方法】MSSA として NCTC8325 由来の BB255、MRSA として COL をもちいた。対数増殖期の菌体にあらかじめ、イミペネム (0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 30°C, 15 分反応させ、PBS で 3 回洗浄後、マイクロビーズを用いて菌体を破碎した。ここから調整した膜画分中の蛋白に対し、蛍光ペニシリン (10 μM Bocillin FL, Molecular Probe 社) を反応させ、上記条件でイミペネムと反応しなかった PBP を検出した。PBP シグナルの定量には蛍光スキャナー (Typhoon 9400, Amersham Biosciences 社) をもちいた。

【結果と考察】破碎して得た膜画分に対してではなく、破碎前の全菌体にイミペネムを反応させておこなった今回の PBP アッセイでは、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 97% の PBP1 がイミペネムと反応することが観察されたが、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のイミペネムをもちいても残り約 3% の PBP1 は未反応のままであった。また、この高濃度条件下でも 20-25% の PBP2 はイミペネムとの反応を免れていた。この現象は、これらの PBP のイミペネムに対する感受性が低いからではない。通常の競合 PBP アッセイのように、菌体破碎によって得られた膜画分中の蛋白に予めイミペネムを反応させ、その後、蛍光ペニシリンによって未反応 PBP を検出すると、イミペネム低感受性 PBP は MRSA のもつ PBP2' 以外には観察されない。同様な現象は、未標識ペニシリン G をもちいておこなったアッセイでも確認することができた。以上のことより、ベータラクタム剤存在下での MRSA の増殖には、PBP2' と、ベータラクタム剤不反応性の少量の PBP1 の両者が必要であると考えることができた (この両者だけで MRSA の増殖に十分であるかどうかは今回の結果からはわからない)。今回おこなった PBP アッセイで観察されたイミペネム易反応性、および不反応性 PBP1 が、各々菌体のどこに存在するのかを明らかにするには、新たな蛍光検出系の開発やベータラクタム剤と反応していない PBP だけを検出できるような抗体をもちいた免疫電顕による観察が必要であると考えられる。

E. faecalis VanB VRE の高頻度伝達性バンコマイシン耐性プラスミドの解析

分担研究者 池 康嘉^{1,2}、研究協力者 富田 治芳¹、鄭 波¹、井上 貴子¹、野村 隆浩¹、
谷本 弘一²、藤本 修平¹、麻 興華¹、宮本 真美子¹

(群馬大学大学院医学系研究科細菌感染制御学¹、同薬剤耐性菌実験施設²)

全国の医療施設における VRE 分離状況調査の結果、回答のあった 1,788 施設中、31 施設 (1.7%) から VRE (VanA、VanB、VanD 型) が分離された。分離された VRE の総数は 128 例 (VanA 型 71 例、VanB 型 56 例、VanD 型 1 例) であった。128 例 (128 株) 中、8 施設から分離された 35 株は *E. faecalis* 菌で、そのうち 31 株は VanB 型、4 株は VanA 型であった。8 施設 31 株の *E. faecalis* 菌のうち、4 施設 25 株の Van 遺伝子が高頻度に接合伝達された。4 施設それぞれの分離数は、VanB 型 19 株、2 株、VanA 型 3 株、1 株であった。このうち *E. faecalis* VanB 型 VRE が 19 株分離された施設の株について解析を行った。この 19 株は、1999 年に日本で初めて起きた VRE 院内感染症事例の分離株である。報告では 4 人の入院患者の喀痰、尿から VRE が分離された。その後、入院患者の便を検査したところ 16 人が VRE を保菌していた。分離された VRE は全て VanB 型 *E. faecalis* 株であり、PFGE による解析から 1 株を除き全て類似の染色体 DNA パターンを示し、同一の株による院内感染が考えられた。これらの株はバンコマイシン耐性プラスミドを保持していた。染色体パターンの異なる 1 株は染色体上に耐性遺伝子が存在した。(Jpn. J. Infect. Dis. 2001. 54:17-22)

耐性遺伝子が染色体に存在する 1 株を除き、全てのバンコマイシン耐性が液体培地中で供与菌当たり 10^{-4} ~ 10^{-6} の高頻度で接合伝達した。代表的な一株 HGH22 を選び解析したところ、これは接合伝達性バンコマイシン耐性プラスミド pUI22 (107kp) の他に接合伝達性エリスロマイシン耐性プラスミド pTI22 (70kb) を保持していた。pUI22 プラスミドにコードされる VanB 型耐性遺伝子は *vanS_B-vanY_B* 領域の塩基配列の解析から *vanB2* 型に分類された。Southern hybridization の解析から pUI22 はフェロモン反応性プラスミドに保存されている接合伝達制御領域を持ち、さらに合成フェロモン cCF10 により凝集が誘導されたことから pCF10 (54kb, Tet^r) 類似のフェロモン反応性接合伝達性プラスミドと考えられた。pUI22 について制限酵素地図を決定した後、shot-gun 法により全塩基配列を決定した。pUI22 は 106,524bp の大きさで、*vanB2* 型耐性遺伝子を含む接合伝達性トランスポゾン Tn1549 (34kb, Van^r) が挿入したフェロモン反応性プラスミドであった。一方 pTI22 はエリスロマイシン耐性の他に β -Hemolysin/Bacteriocin (Hly/Bac) をコードし、液体培地中で供与菌当たり 10^{-3} ~ 10^{-4} の高頻度で接合伝達した。合成フェロモン cAD1 によって凝集が誘導されたことから pTI22 は pAD1 (60kb, Hly/Bac) 類似のフェロモン反応性プラスミドと考えられた。これらのフェロモン反応性プラスミドを保持する VRE (*E. faecalis*) 株がクローナルに複数の患者の腸管内に定着していたことから、この株には何らかの強い定着因子が存在することが推察された。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Where has vancomycin-
heterogeneously resistant
Staphylococcus
aureus gone?

Yoshichika Arakawa
Yasuyoshi Ike
Mitsuaki Nagasawa

Reprinted from THE LANCET
24 April 2004 Vol. 363
No. 9418 Page 1401

Where has vancomycin-heterogeneously resistant *Staphylococcus aureus* gone?

Sir—7 years have passed since a strain of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin was first identified in a Japanese hospital in 1996.¹ The strain was initially characterised as containing a small number of vancomycin-intermediately resistant subpopulations (vancomycin minimum inhibitory concentration [MIC], ≥ 8 mg/L), such as Mu50, at a frequency of 1 per 1 000 000. Warnings were sent out that such strains had already been disseminated in several Japanese medical institutions, despite the fact that they would hardly be detected by routine antimicrobial susceptibility testing recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards, since only around 1000 colony forming units of bacterial cells undergo testing.

The US Centers for Disease Control and Prevention issued a prompt alert for the detection of vancomycin-intermediately resistant *S aureus* (GISA),² selected by vancomycin use from the vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus* Mu3-like strain.¹ Many clinicians and microbiologists were perplexed by the further proliferation of such hazardous bacteria worldwide.

Although we had growing suspicions, after the first report,¹ regarding microbial genetics, in 1997 we did nationwide surveillance on the vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus* and GISA strains. As we expected, no such strain, as designated in the first report,¹ has been detected.³ Furthermore, if the genetically definable vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus* had been widely distributed in Japanese clinical settings in 1996,¹ as reported, GISA strains should have been selected and widely proliferated in Japanese clinical environments due to substantial use of vancomycin over the past 7 years. No such phenomenon has been ascertained in Japan to date, despite many clinical microbiologists' attempts to isolate unique strains that show heterogeneous vancomycin resistance. Indeed, the GISA strain can be isolated after persistent passages of *S aureus* on brain heart infusion agar plates supplemented with sub-MIC of vancomycin. However, as far as we know few GISA strains, such as Mu50, that show an intermediately vancomycin-resistant profile, have been directly isolated from clinical specimens in Japan.

Bacteria have an innate ability to adapt to environmental stress or hazardous conditions by changing their metabolic pathways. Tomasz and colleagues have elucidated the molecular

mechanisms underlying the vancomycin-resistant phenotype in *S aureus* through a series of studies.⁴ Furthermore, involvement of the multiple molecular mechanisms responsible for the GISA phenotype has been elucidated.⁵ However, the genetic context of the vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus* containing a small number of GISA subpopulations has not been solved, although the total genomic sequence of a GISA strain, Mu50, has been disentangled.

The emergence of vancomycin-resistant *S aureus* harbouring the *van* gene cluster, such as the Michigan strain, is a serious clinical matter. However, a large amount of medical resources, including Mu3 medium, and special efforts by clinical microbiologists have been wasted thus far in the detection of the scientifically incomprehensible vancomycin-heterogeneously resistant *S aureus*. Therefore, investigators¹ who earlier reported the dissemination of the illusory strain should perhaps provide a detailed supplementary update report on why it has vanished from Japan.

*Yoshichika Arakawa, Yasuyoshi Ike, Mitsuaki Nagasawa

*Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan (YA); Department of Bacteriology and Bacterial Infection Control, Graduate School of Medicine, Gunma University, Maebashi, Gunma, Japan (YI); and Department of Laboratory Medicine, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan (MN)
(e-mail: yarakawa@nih.go.jp)

- 1 Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; **350**: 1670–73.
- 2 Anon. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin—United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; **46**: 765–66.
- 3 Ike Y, Arakawa Y, Ma X, et al. Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 4445–51.
- 4 Sieradzki K, Tomasz A. Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2003; **185**: 7103–10.
- 5 Walsh TR, Howe RA. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 2002; **56**: 657–75.

The Lancet is a weekly subscription journal. For further information on how to subscribe please contact our Subscription Department
Tel: +44 (0) 20 7611 4102 Fax: +44 (0) 20 7611 4479
North America Tel: +1 (800) 462 6198 Fax: +1 (212) 633 3974

Nosocomial Spread of Ceftazidime-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing a Novel Class A β -Lactamase, GES-3, in a Neonatal Intensive Care Unit in Japan

Jun-ichi Wachino,^{1,2} Yohei Doi,¹ Kunikazu Yamane,¹ Naohiro Shibata,¹ Tetsuya Yagi,¹ Takako Kubota,³ Hideo Ito,² and Yoshichika Arakawa^{1*}

Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo,¹ Central Clinical Laboratory, Kagoshima Municipal Hospital, Kagoshima,³ and Program in Radiological and Medical Laboratory Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya,² Japan

Received 8 August 2003/Returned for modification 16 November 2003/Accepted 12 December 2003

Klebsiella pneumoniae strain KG525, which showed high-level resistance to broad-spectrum cephalosporins, was isolated from the neonatal intensive care unit (NICU) of a Japanese hospital in March 2002. The ceftazidime resistance of strain KG525 was transferable to *Escherichia coli* CSH-2 by conjugation. Cloning and sequence analysis revealed that production of a novel extended-spectrum class A β -lactamase (pI 7.0), designated GES-3, which had two amino acid substitutions of M62T and E104K on the basis of the sequence of GES-1, was responsible for resistance in strain KG525 and its transconjugant. The *bla*_{GES-3} gene was located as the first gene cassette in a class 1 integron that also contained an *aacAI-orfG* fused gene cassette and one unique cassette that has not been described in other class 1 integrons and ended with a truncated 3' conserved segment by insertion of IS26. Another five ceftazidime-resistant *K. pneumoniae* strains, strains KG914, KG1116, KG545, KG502, and KG827, which were isolated from different neonates during a 1-year period in the same NICU where strain KG525 had been isolated, were also positive for GES-type β -lactamase genes by PCR. Pulsed-field gel electrophoresis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR analyses displayed genetic relatedness among the six *K. pneumoniae* strains. Southern hybridization analysis with a GES-type β -lactamase gene-specific probe showed that the locations of *bla*_{GES} were multiple and diverse among the six strains. These findings suggest that within the NICU setting genetically related *K. pneumoniae* strains carrying the *bla*_{GES} gene were ambushed with genetic rearrangements that caused the multiplication and translocation of the *bla*_{GES} gene.

Resistance to β -lactam antibiotics mainly depends on the production of β -lactamases. To date, a large variety of β -lactamases which were classified by their amino acid sequences and functional substrate specificity profiles in various gram-negative bacilli such as *Pseudomonas* spp. and members of the family *Enterobacteriaceae* have been documented (6). Since the late 1980s, extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) derived from TEM- and SHV-type penicillinases capable of hydrolyzing the oxymino-cephalosporins have been spreading globally, mainly in the *Enterobacteriaceae*, including *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* (5, 23, 29). Moreover, various non-TEM-, non-SHV-type class A β -lactamases exhibiting extended-spectrum activities, including CTX-M-type (13, 31, 38, 39, 41), SFO-type (18), VEB-type (12, 20, 25), and GES-type (10, 11, 19, 24, 28, 37) β -lactamases, have also been reported in various gram-negative bacilli. Among the GES-type β -lactamases, GES-1, which was found to be produced by *K. pneumoniae* ORI-1, identified from a child transferred from French Guiana to France in 1998, was the first report of the GES-type class A β -lactamase (24); and GES-1-producing *K. pneumoniae* strains have caused nosocomial infections in Portugal (9). IBC-1 was

identified in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece in 1999 (11), and IBC-1-producing *E. cloacae* has also been reported to cause nosocomial infections in a neonatal intensive care unit (NICU) (17). GES-2, which displayed more extended-spectrum activity against imipenem compared with that of GES-1, was reported in *Pseudomonas aeruginosa* from South Africa (28) in 2000, and GES-2 producers also caused a nosocomial infection (27). All three genes, *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-2}, and *bla*_{IBC-1}, were found to be located as a gene cassette within similar class 1 integrons.

Recently, six clinical isolates of *K. pneumoniae* showing high-level resistance to various broad-spectrum cephalosporins, including ceftazidime, were identified from the NICU of a Japanese hospital, and conventional PCR analyses for TEM-derived ESBLs and CTX-M enzymes failed to specify their genetic determinants. In the present study, therefore, we characterized the molecular mechanism underlying the multiple-cephalosporin resistance among these six strains, as well as the organizations of their genetic environments.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids. The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Six *K. pneumoniae* clinical strains had been isolated from neonates over 1 year, from September 2001 to August 2002, and were stored in the clinical microbiology laboratory of the hospital until this study. Biochemical phenotypic identification of these strains was carried out by the analytical profile index procedure (API 20E system; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). A pre-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan. Phone: 81-42-561-0771, ext. 500. Fax: 81-42-561-7173. E-mail: yarakawa@nih.go.jp.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Characteristics	Source or Reference
<i>K. pneumoniae</i> KG914, KG1116, KG525, KG545, KG502, KG827	Clinical isolates from neonatal specimens	This study
<i>E. coli</i>		
CSH-2	<i>metB</i> F ⁻ nalidixic acid ^r rifampin ^r	T. Sawai, Chiba University
XL1-Blue	<i>supE44 recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(rK⁻ mK⁺) relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB⁺ lac1qZΔM15::Tn10(Tet^r)</i>]	Stratagene
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^r)	Invitrogen
Plasmids		
pKGC525	A natural plasmid carrying <i>bla</i> _{GES-3} of <i>K. pneumoniae</i> KG525	This study
pKGB525	A recombinant plasmid carrying a 6.7-kb BamHI fragment containing <i>bla</i> _{GES-3} of <i>K. pneumoniae</i> KG525	This study
pKGM525	A recombinant plasmid carrying a 11.6-kb BamHI fragment containing <i>bla</i> _{GES-3} of <i>K. pneumoniae</i> KG525	This study
pTAGES3	A recombinant plasmid carrying a PCR fragment with the entire <i>bla</i> _{GES-3} sequence and its promoter region cloned into the pCR2.1 vector	This study
pGES3	A recombinant plasmid carrying EcoRI fragment from pTAGES3	This study
pIBC1	A recombinant plasmid carrying <i>bla</i> _{IBC-1} constructed from pGES3	This study
pBCSK+	A cloning vector; chloramphenicol ^r	Stratagene
pCR2.1	A cloning vector; ampicillin ^r kanamycin ^r	Invitrogen
pET29a(+)	An expression vector; kanamycin ^r	Novagen
pET-GES3	A recombinant plasmid carrying PCR-amplified <i>bla</i> _{GES-3} gene ligated to pET29a(+)	This study

liminary double-disk synergy test was carried out with disks containing ceftazidime and amoxicillin-clavulanate. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth supplemented with appropriate antibiotics, unless specified otherwise.

Antibiotic susceptibility testing. The following antibiotics were obtained from the indicated sources: ampicillin, amoxicillin, and cefminox, Meiji Seika Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan; piperacillin, Toyama Chemical Co., Ltd., Toyama, Japan; cephaloridine and moxalactam, Shionogi & Co., Ltd., Osaka, Japan; cefmetazole and chloramphenicol, Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan; cefotaxime and cefipime, Aventis Pharma, Ltd., Tokyo, Japan; ceftazidime and clavulanic acid, GlaxoSmithKline K. K., Tokyo, Japan; sulbactam, Pfizer Pharmaceutical Inc., Tokyo, Japan; tazobactam, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan; cefepime, Bristol Pharmaceuticals K. K., Tokyo, Japan; aztreonam, Eisai Co., Ltd., Tokyo, Japan; imipenem, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan; and rifampin, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan. The MICs of the β -lactams were determined by the agar dilution method, according to the recommendations of National Committee for Clinical Laboratory Standards document M7-A5 (21). *E. coli* ATCC 25922 and ATCC 35218 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and served as control strains in the antimicrobial susceptibility testing.

PCR amplification. To amplify the broad-spectrum β -lactamase genes from the six clinical strains, PCR analyses were performed with sets of primers specific for various β -lactamase genes found in Japan—including the TEM-derived extended-spectrum β -lactamase (39); CMY-2-, MOX-1-, and DHA-1-type β -lactamases (8, 40, 41); and CTX-M-1-, CTX-M-2-, CTX-M-9-, IMP-1-, IMP-2-, and VIM-2-type β -lactamases (13, 26, 30, 31, 33, 39)—under the conditions described elsewhere (33). Detection of the SHV-type β -lactamase gene was not performed because most clinical *K. pneumoniae* strains carry the LEN-1 and/or SHV-1 β -lactamase gene on their chromosomes (1, 7). In order to detect the GES-type β -lactamase gene, an 827-bp internal fragment of the gene was amplified with primers GES-A (5'-CTT CAT TCA CGC ACT ATT AC-3') and GES-B (5'-TAA CTT GAC CGA CAG AGG-3') under the conditions described above.

Conjugal transfer of β -lactam resistance. Conjugal transfer of the ceftazidime resistance of *K. pneumoniae* KG525 to a recipient *E. coli* strain, strain CSH-2 (F⁻ *metB*, resistant to nalidixic acid and rifampin), was performed by the filter mating method. Transconjugants were selected on LB agar plates containing ceftazidime (2 μ g/ml), rifampin (100 μ g/ml), and nalidixic acid (50 μ g/ml).

Cloning experiment and DNA sequencing. Basic recombinant DNA techniques were performed as described by Sambrook et al. (32). Total DNA of *K. pneumoniae* KG525 was extracted and digested with BamHI. The resultant fragments were ligated into cloning vector pBCSK+ (Stratagene, La Jolla, Calif.) restricted with the same enzyme. Transformants were selected on LB agar plates

containing chloramphenicol (30 μ g/ml) and ampicillin (50 μ g/ml) or ceftazidime (2 μ g/ml). The nucleotide sequence of the cloned fragment was determined with BigDye terminator cycle Sequencing Ready Reaction kits and an ABI 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) by using custom sequencing primers.

Site-directed mutagenesis for comparison of GES-3 with IBC-1. PCR-based site-directed mutagenesis of the *bla*_{GES-3} gene was performed with the LA PCR In Vitro Mutagenesis kit (TAKARA Bio Inc., Ohtsu, Japan). In brief, the entire *bla*_{GES-3} gene and its promoter region were amplified by PCR and cloned into plasmid pCR2.1 with the TA cloning kit (Invitrogen, NV, Laek, The Netherlands). One plasmid, pTAGES3, was selected after it was confirmed that it contained no amplification error and was then digested with EcoRI. The resultant fragment was recombined into pBCSK+. The resultant plasmid, pGES3, with an insert carrying the *bla*_{GES-3} gene and its promoter region was used to introduce a single nucleotide mutation (C to T) at nucleotide position 167, which leads to an amino acid substitution (T to M) at position 62 in GES-3, resulting in the conversion of the gene product from GES-3 to IBC-1 expressed under the same promoter.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR analyses. Total DNA was prepared from six *K. pneumoniae* strains (34) and digested overnight with XbaI (New England Biolabs, Beverly, Mass.). The digested DNA was electrophoresed with a CHEF-DRII Drive Module (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.) under the following conditions: pulses ranging from 10 to 40 s at 6 V/cm for 20 h at 16°C. Six *K. pneumoniae* strains were also typed with the primer ERIC-2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'). The PCR was carried out under the conditions described elsewhere (36).

Southern hybridization. Large plasmids were prepared from six *K. pneumoniae* strains by the procedure described by Kado and Liu (16). The chromosomal DNA was extracted from each isolate by the method of Stauffer et al. (35). Both plasmid and chromosomal DNA preparations were separately subjected to Southern hybridization experiments. The 827-bp DNA probes were amplified by a PCR with primers 5'-CTT CAT TCA CGC ACT ATT AC-3' and 5'-TAA CTT GAC CGA CAG AGG-3'. The PCR amplicons were labeled with digoxigenin (DIG) by a random priming labeling method with the PCR DIG detection system, as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). Southern hybridization was performed by the protocol of the manufacturer (Roche Diagnostics).

Purification of GES-3 β -lactamase. To overproduce GES-3 β -lactamase in *E. coli*, the *bla*_{GES-3} gene was amplified by using two primers, primer GES-F (5'-CAT ATG CGC TTC ATT CAC GCA CTA TTA CTG-3'), which was designed to add an NdeI linker (underlined), and primer GES-R (5'-GTC GAC

TABLE 2. MICs for six *K. pneumoniae* clinical isolates from a NICU

<i>K. pneumoniae</i> strain	Date of isolation (mo/day/yr)	Site of isolation	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a													
			AMX + CLA	PIP	PIP + TZB	CAZ	CAZ + CLA	CTX	ATM	CMZ	FEP	IPM	GEN	AMK	LVX	CIP
KG914	9/14/01	Bronchial secretion	>128	>128	128	>1,024	512	64	64	16	32	0.13	1	32	<0.06	<0.06
KG1116	11/16/01	Bronchial secretion	>128	>128	128	>1,024	128	64	64	16	32	0.13	0.5	32	<0.06	<0.06
KG525	3/4/02	Stool	>128	128	128	>1,024	256	64	64	16	16	0.13	2	64	<0.06	<0.06
KG545	3/7/02	Nasal mucosa	>128	>128	>128	>1,024	1,024	128	128	128	64	0.5	2	64	0.25	0.25
KG502	5/2/02	Pus	>128	128	64	1,024	512	16	32	>128	8	8	2	32	0.13	<0.06
KG827	8/27/02	Bronchial secretion	>128	128	32	>1,024	256	16	64	>128	32	0.5	2	32	2	1

^a Abbreviations: AMX, amoxicillin; CLA, clavulanic acid; PIP, piperacillin; TZB, tazobactam; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; ATM, aztreonam; CMZ, cefmetazole; FEP, cefepime; IPM, imipenem; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; LVX, levofloxacin; CIP, ciprofloxacin.

CTA TTT GTC CGT GCT CAG GAT GAG-3'), which was designed to add an Sall linker (underlined), and DNA polymerase (Expand High Fidelity PCR System; Roche Diagnostics), according to the instructions of the manufacturers. The resulting products were cloned into plasmid pCR2.1 with the TA cloning kit (Invitrogen, NV) and subjected to confirmatory sequencing. One plasmid with no amplification error was selected and was partially double digested with NdeI and Sall and then subcloned into pET-29a(+) (Novagen, Madison, Wis.), which had been digested with the same enzymes. The expression vector constructed, named pET-GES3, was introduced into *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen). *E. coli* BL21(DE3) pLysS carrying plasmid pET-GES3 was cultured in 1 liter of LB broth containing kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$). Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (final concentration, 1 mM) was added when the culture reached an A_{600} of 0.6, and the culture was incubated for an additional 2 h. The cells were harvested by centrifugation and were suspended in 5 ml of 20 mM bis-Tris buffer (pH 6.5). The suspension was passed through a French pressure cell twice and was then centrifuged at 100,000 $\times g$ for 1 h at 4°C. The supernatant was used for subsequent chromatographic purification. Size-exclusion chromatography was performed on a HiLoad 16/60 Superdex 200 prep-grade column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) pre-equilibrated with 20 mM bis-Tris buffer (pH 6.5). Fractions containing β -lactamase activity were collected and applied to an anion-exchange Hitrap Q HP column with the same buffer. β -Lactamase activity was recovered in the flowthrough and was dialyzed against 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) overnight at 4°C. This partially purified enzyme was loaded onto a Hitrap Q HP column (Pharmacia Biotech) pre-equilibrated with the same buffer and eluted with a linear gradient of NaCl. Fractions presenting high levels of activity were pooled and dialyzed against 50 mM phosphate buffer (pH 7.0).

Isoelectric focusing (IEF). Fifty milliliters of the bacterial culture was centrifuged, and the cell pellet was suspended in 5 ml of distilled water. A crude periplasmic preparation containing β -lactamase was obtained by freezing-thawing the bacterial suspension three times, followed by ultracentrifugation (40,000 $\times g$) for 1 h. The supernatant was condensed to 1/10 volume with an Ultrafree-15 Centrifugal Filter Device (Millipore Corporation, Bedford, Mass.). To determine the isoelectric point (pI), 5 μl of the condensed supernatant containing β -lactamase was loaded onto an Ampholine PAG plate (pH 3.5 to 9.5; Pharmacia Biotech) with a Multiphor II electrophoresis system (Pharmacia Biotech). The pI of the β -lactamase was measured by staining the gel with a 0.05% solution of nitrocefin. Purified GES-3 β -lactamase was also electrophoresed on the Ampholine PAG plate and stained with Coomassie blue.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank nucleotide database under accession number AB113580.

RESULTS

Characteristics of six *K. pneumoniae* clinical isolates. The susceptibilities of the six isolates to β -lactams are presented in Table 2. All isolates were resistant to piperacillin, ceftazidime, and aztreonam. The MICs of cefotaxime, cefmetazole, cefepime, and imipenem for the isolates were variable. Despite the addition of clavulanic acid, these isolates kept their high-level resistance to ceftazidime (MICs, ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$). This observation was consistent with the negative results of the double-disk synergy test with two disks containing ceftazidime and

amoxicillin-clavulanate, respectively. Metallo- β -lactamase production was not detected by using a thiol compound (2). PCR analyses performed preliminarily to detect broad-spectrum β -lactamase genes including TEM derivatives, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, MOX-1 (CMY-9), CMY-2, DHA-1, IMP-1, IMP-2, and VIM-2, all of which had already been identified in Japan, failed to give positive results.

Transfer and cloning of β -lactamase genes. The ceftazidime resistance determinant of representative strain *K. pneumoniae* KG525 was successfully transferred to a recipient strain, *E. coli* CSH-2; and this finding indicated that the genetic determinant was located on a transferable plasmid. Two ceftazidime-resistant *E. coli* clones, each of which harbored a plasmid containing BamHI fragment inserts of approximately 6.7 and 11.6 kb, respectively, were obtained as a result of the cloning experiment. These two recombinant plasmids contained the same 864-bp open reading frame (ORF) encoding a putative β -lactamase which had conserved structural features of the active site of Ambler class A β -lactamases. The deduced amino acid sequence of the β -lactamase showed an amino acid substitution of M62T (a point mutation of T to C at nucleotide position 167) compared with the amino acid sequences of GES-1 (24), GES-2, and IBC-1, as well as an additional E104K substitution in comparison with the amino acid sequences of GES-1 and GES-2 (Fig. 1). Moreover, an N170G substitution was found in GES-3 compared with the amino acid sequence of GES-2, although the G residue at amino acid position 170 was conserved in IBC-1 and GES-1, as well as in GES-3. Therefore, we named this novel class A β -lactamase GES-3, although GES-1 is based on "Guiana extended spectrum" (24).

Antibiotic susceptibilities. The MICs of the β -lactams for parent strain *K. pneumoniae* KG525, transconjugant *E. coli* CSH-2(pKGC525), and transformant *E. coli* XL1-Blue(pKGB525) are listed in Table 3. Parental strain *K. pneumoniae* KG525 was resistant to most β -lactams except the cephamycins and carbapenems. The tranconjugant and transformant were resistant to ceftazidime, and the MICs of the other β -lactams were lower for the tranconjugant and the transformant than for the parent strain. The changes in the MICs of cefotaxime and ceftazidime for parent strain KG525 were apparently observed by the addition of β -lactamase inhibitors, such as clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam, while decreases in the MICs of amoxicillin, ampicillin, and piperacillin, as well as cefotaxime and ceftazidime, were observed for the *E. coli* tranconjugant and transformant in the presence of the inhibitors.