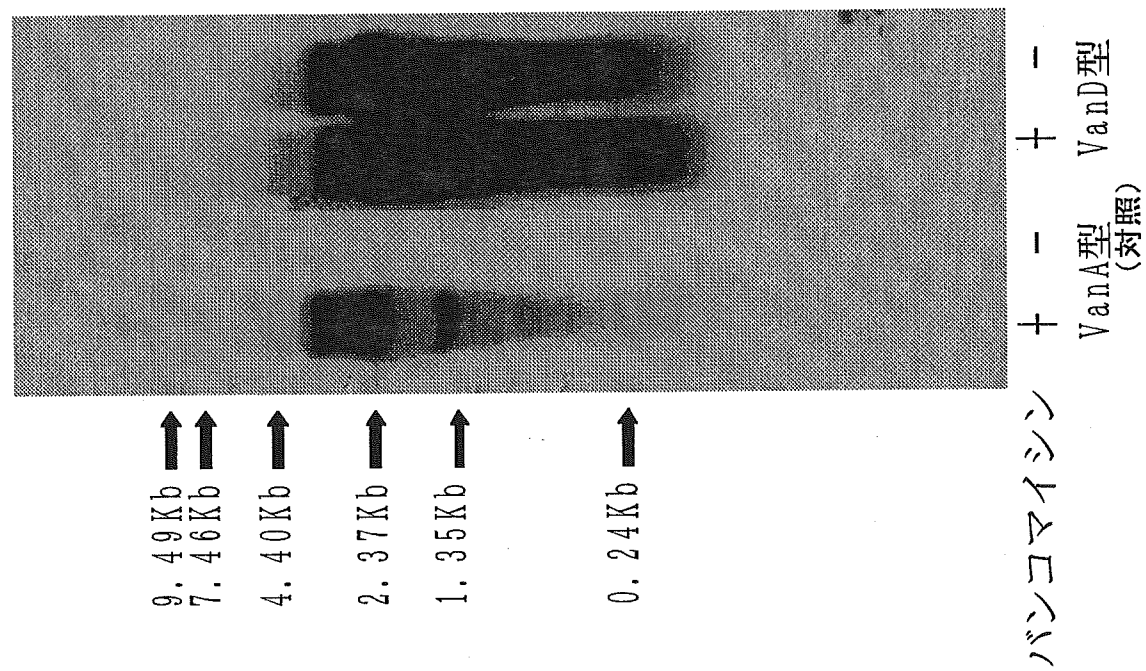


図3 VanD型耐性遺伝子の発現



- probe: vanA遺伝子 (lane1、2)
- probe: vanD遺伝子 (lane3、4)

日本初の VRE 院内感染症株から分離されたバンコマイシン耐性プラスミドの解析

主任研究者 池 康嘉^{1, 2}

研究協力者 富田 治芳¹、麻 興華¹、石綿 司¹、浦部 優子¹、藤本修平¹

群馬大学大学院 医学系研究科 生体防御機構学講座 細菌感染制御学¹、
群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設²、(財)ヒューマンサイエンス振興財団³

要旨[背景・目的] 1999年7月、日本で初めて VanB 型のバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が検出された。本実験では、そのとき検出された菌から *vanB* 遺伝子のコードされたプラスミドを単離し、解析を行うことを目的とした。**[対象と方法]** NKH 病院にて分離された 19 の菌株を対象に抗生剤耐性実験、接合伝達実験を行い、代表菌株より得られたプラスミド (pUI22) を対象に PCR およびサザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。**[結果]** プラスミド pUI22 は 117 kbp であった。また pUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされており、そのタイプは *vanB2* であることが判明した。また、フェロモン反応性の接合伝達遺伝子群もコードしており、高頻度で耐性を伝達することが明らかとなった。バンコマイシン以外の薬剤に対する耐性遺伝子はコードしていなかった。**[結語]** 同じプラスミド上に *vanB* 遺伝子とフェロモン反応性遺伝子がコードされているという結果は、この VRE の急速な伝播を示唆している。

キーワード：VRE, VanB, 接合伝達性プラスミド, フェロモン

はじめに

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は、MRSA などとともに世界的に問題となっている院内感染原因菌のひとつである。特に米国では救急治療室、移植・癌・腎疾患病棟などで VRE の水平伝播による院内感染が多発し、その増加は社会的に問題化している。VRE 感染症患者あるいは保菌患者の殆どが免疫機能低下患者であり、感染症治療の経過中に抗菌剤投与による菌交代症の中で出現する。現在、6 種の耐性型を持つ VRE が発見、同定されているが、臨床的あるいは院内感染

対策上問題となるものは、*vanA* と *vanB* の耐性遺伝子を保有する VRE である。VanA 型はバンコマイシン、テイコプラニンの両者に耐性であるのに対し、VanB 型はテイコプラニンに感受性である。VanA 型と VanB 型の腸球菌におけるグリコペプチド系抗生剤耐性は、細胞壁構成タンパク質の末端が *D*-lactate (*D*-Lac) に変化していることによるものである。グリコペプチド系抗生物質であるバンコマイシンやテイコプラニンは、細胞壁の構成成分タンパク質の C 末端残基 *D*-alanyl-*D*-alanine (*D*-Ala-*D*-Ala) に結合し、細胞壁の構築を阻害する。¹ VCM 耐性菌株ではこの C 末端が

D-Ala-D-Lac に変化しており、このため VCM が結合できなくなり耐性となる。VCM 耐性に関連する遺伝子は、*vanRS* と *vanYWHBX* からなる *van* オペロンで構成される。*van* オペロンは多くの場合、接合・転移に関連する染色体やプラスミドの一部だと考えられている。*vanA* オペロンは通常プラスミド上に存在し、Tn1546 により伝達される。² 一方、*vanB* オペロンは通常染色体上に存在する。

遺伝子伝達機構は、微生物が抗生剤耐性を伝播する過程において重要な役割を果たす。腸球菌は、独特な方法で同種間や異種間でプラスミドを高頻度に伝達することができる。³⁻⁶ 腸球菌プラスミドには、限られた種にのみ存在するフェロモン反応性のプラスミド^{3,4,7}と、*Enterococcus faecalis*^{8,9}と *Streptococcus agalactiae*^{10,11}から分離された、固体培地において低頻度で伝達し、多種に渡り存在できるプラスミドの2種類がある。⁸⁻¹² フェロモン反応性のプラスミドを保有しているのは主に *E. faecalis* であり、¹³⁻¹⁸ その伝達は、数時間の液体培地中での接合においてドナー1 に対し $10^0 \sim 10^{-2}$ の高頻度で起こる。この型のプラスミドは通常 45 kb 以上の大きさであり、受容菌が分泌する性フェロモンに反応して伝達を開始する。¹³⁻¹⁸ この接合シグナルにより菌の接合凝集が起こる。このとき性フェロモンは、プラスミド伝達に必要な一連の遺伝子群を発現させる。プラスミドを保有しない受容菌は複数の性フェロモンを分泌し、各々関与するフェロモン反応性プラスミドを持つ供与菌に特異的に影響を与える。受容菌が1つのプラスミドを獲得すると、その反応に関与していた1つの性フェロモンの分泌は終了するが、それ以外のフェロモン分泌は続く。性フェロモンは、供与菌の自己凝集を誘導する。フェロモン反応性プラスミドにコードされている遺伝因子としては、溶血毒素、バクテリオシン(抗菌活性物質)、抗生剤耐性、紫外線耐性がある。^{13,19-27}

近年、日本においても複数の病院から VRE 検出の報告がなされている。1999年7月に、日本

で初めて VanB 型の VRE が検出された。この *vanB* 遺伝子は 110-kb プラスミドにコードされていることがわかったが、そのプラスミド DNA の単離に成功しておらず、性質等は不明である。²⁸ 今回我々は、そのときに検出された菌を用いて、高頻度にバンコマイシン (VCM) 耐性遺伝子が伝達されることを確認後、そのバンコマイシン耐性プラスミドの単離、解析を行った。

対象と方法

菌株と培養方法

今回の調査には、H病院にて分離された *E. faecalis* (VanB type) 19 菌株を用いた。これらは、日本で初めて検出された VanB 型の VRE である。²⁸ 今回の実験においてこれらの菌株は、Todd-Hewitt broth (THB) または Brain Heart Infusion (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 中で培養した。

接合伝達実験

バンコマイシン (VCM) 耐性が接合伝達されるか否かについて、検出された 19 株においての実験を行った。受容菌として *E. faecalis*、プラスミドを持たない FA2-2 (リファンピシン、フシジン酸耐性) と JH2SS (ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性) を用い、液体培地中での接合伝達実験を行った。滅菌された試験管に Todd-Hewitt broth (THB) 5ml、受容菌 500.1、供与菌 50.1 を混合し、37°C で 3 時間培養した。その後、混合液 50.1 を vancomycin (6. g/ml) と抗生剤を入れた固体培地 Brain Heart Infusion (BHI) に植え、37°C で 48 時間培養した。発育したコロニーは、同種の培地にて純培養した。同様の手法で、再伝達実験、再々伝達実験も行った。固体培地の抗生剤濃度はそれぞれリファンピシン 25. g/ml、フシジン酸 25. g/ml とストレプトマイシン 250. g/ml、スペクチノマイシン 250. g/ml

とした。

抗生剤耐性実験

VCM 以外の抗生剤に対する耐性も伝達されているかを確認するため、4種類の抗生剤について実験を行った。HGH15、22、25 及びこれらから得られた伝達株のそれぞれを、各抗生剤を含む THB 培地で 37°C、48 時間培養した。抗生剤の種類と濃度は、アミカシン 64. g/ml、レボフロキサシン 8. g/ml、カナマイシン 100. g/ml、ゲンタマイシン 100. g/ml とした。

アガロースゲル電気泳動

分離された VRE の遺伝子解析のため、プラスミド DNA を *EcoRI* で切断し、アガロースゲルで電気泳動した。プラスミド DNA の抽出には、アルカリ少量法を用いた。²⁹ 電気泳動終了後、アガロースゲルを臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下、確認、撮影した。

pUI22 の制限酵素地図の作成

pUI22 の DNA を *EcoRI* で切断後電気泳動し、各断片の大きさを測定した。また、*BamHI*、*NcoI*、*XbaI* 制限酵素のうち 1 種類、2 種類、3 種類を使って完全に DNA を切断、電気泳動した後各断片の大きさを測定し、制限酵素地図を作成した。

PCR

抽出された HGH22 の DNA を用いて PCR を行った。混合液の組成は、DNA サンプル 5.1、各プライマー 0.5.1 (100pM/.1)、dNTP 混合液 4.1、.Taq DNA polymerase 0.25.1、.Taq 添付 10×PCR buffer 5.1、滅菌蒸留水 35.1 とした。

DNA 増幅のための PCR は、DNA thermal cycler (Gene Amp 9700) を用いて、最初のサイクルを 95°C で 2 min、95°C で 1 min、56°C で 1 min、72°C で 2 min を単位とするものを 30 サイクル、最終サイクルを 72°C で 2 min とした。

DNA シークエンスのための混合液の組成は、サ

ンプル DNA 4.1、各プライマー溶液 (3.3pM/.1) 1.1、half TERM XL 2.1、Big-Dye Terminator RR Mix 2.1、滅菌蒸留水 1.1 とした。PCR には、96°C で 30 sec、50°C で 15 sec、60°C で 4 min を 25 サイクル行う Big Dye 法を用いた。PCR 処理後の DNA は、電気泳動後、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて回収した。

サザンハイブリダイゼーション

DIG 標識 DNA を用いた dioxigenin-based nonradioisotope system (Boehringer GmbH) を標準のプロトコルにしたがって行った。³⁰

結 果

接合伝達と抗生剤耐性実験

HGH21 を除く全ての菌株は、等しい抗生剤耐性を示した。VCM 耐性は液体培地中において、高頻度で伝達された (表 1)。

表 1. VanB 耐性の接合伝達頻度

菌株	遺伝子型	伝達頻度 (供与菌当り)
HGH7	<i>vanB</i>	10 ⁻⁷
HGH8	<i>vanB</i>	10 ⁻⁷
HGH9	<i>vanB</i>	10 ⁻⁵
HGH10	<i>vanB</i>	10 ⁻⁵
HGH11	<i>vanB</i>	10 ⁻⁵
HGH12	<i>vanB</i>	10 ⁻⁴
HGH13	<i>vanB</i>	10 ⁻⁵
HGH14	<i>vanB</i>	10 ⁻³
HGH15	<i>vanB</i>	10 ⁻⁷
HGH16	<i>vanB</i>	10 ⁻⁶
HGH17	<i>vanB</i>	10 ⁻⁵
HGH18	<i>vanB</i>	10 ⁻⁴
HGH19	<i>vanB</i>	10 ⁻⁵
HGH20	<i>vanB</i>	10 ⁻⁶
HGH21	<i>vanB</i>	10 ⁻⁵
HGH22	<i>vanB</i>	10 ⁻⁷
HGH23	<i>vanB</i>	10 ⁻⁵
HGH24	<i>vanB</i>	10 ⁻³
HGH25	<i>vanB</i>	10 ⁻³

電気泳動を行った。pUI22 を *EcoRI* で切断したところ

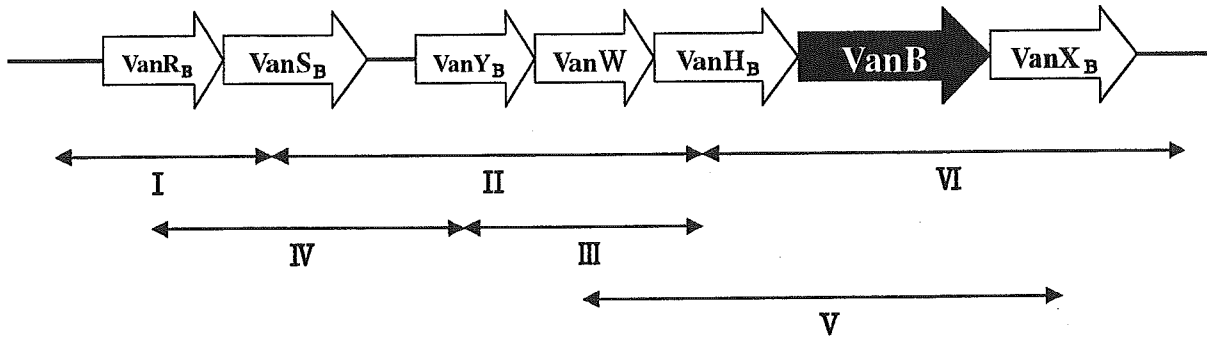


図 2. *vanB* 遺伝子のクラスター

配列は 5' から 3' 方向に示してある。

Combination		Forward primers		Reverse primers
I	<i>vanB-vanN_B1</i>	TGGGGCATTACAGGGCGTTG	<i>vanB-vanS_B2</i>	GCTGTGCTCCATCGCTCTG
II	<i>vanS_B-vanY_B1</i>	ATATGCGCTGGAAAACACCTC	<i>vanB-vanH_B2</i>	TGCGGAAAGCATTGCTCTCA
III	<i>vanB-vanY_B3</i>	ATATGTCGGCATCGAAGCTG	<i>vanB-vanH_B2</i>	TGCGGAAAGCATTGCTCTCA
IV	<i>vanB-vanR_B3</i>	TGACGGTGTATGGCAGCACAG	<i>vanS_B-vanY_B2</i>	CCCCAGATTGTTCCATATGCC
V	<i>vanB-vanW_B1</i>	ACGGATGCAAGTTGCCTTAG	<i>vanB-vanX_B2</i>	CCAACGAACACCATGCAACA
VI	<i>vanB-vanH_B1</i>	GCTGCGAGATACCACAGAAA	<i>vanB-vanN_B2</i>	AGCAGATTCCATCAGCGCAG

表 2. 用いたプライマーの組み合わせ

再伝達実験、再々伝達実験においても、ほとんどの菌で耐性の伝達が確認された。接合伝達の実験中、液体培地中でフェロモン誘発性の凝集に似た自己凝集塊が観測され、このことから、供与菌がフェロモン反応性のプラスミドを保有していることが推測された。また VCM 以外の抗生剤についての耐性遺伝子は伝達されていないことが判明した。

接合伝達性 VCM 耐性プラスミドの単離

接合伝達に関与するプラスミドの解析を行うために、伝達実験で得られた伝達株からプラスミドを毎回抽出・解析した。各接合伝達株は数個のプラスミドを保有しており、それぞれの電気泳動バンドパターンは似ていた。数回の伝達実験を繰り返した結果、HGH22 から得られた VCM 耐性伝達株が、単一のプラスミドを保有していることがわかった。そのプラスミドを pUI22 とし、対象と方法に記した方法で切断し、アガロースゲル電

ろ 19 の断片が見られ、その大きさを測定したところ、pUI22 の全体の大きさは約 117 kbp ということがわかった。また、pUI22 を 4 種類の制限酵素 (*Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I, *Xba*I) で切断し、その結果から、図 1 に示す制限酵素地図を作成した。

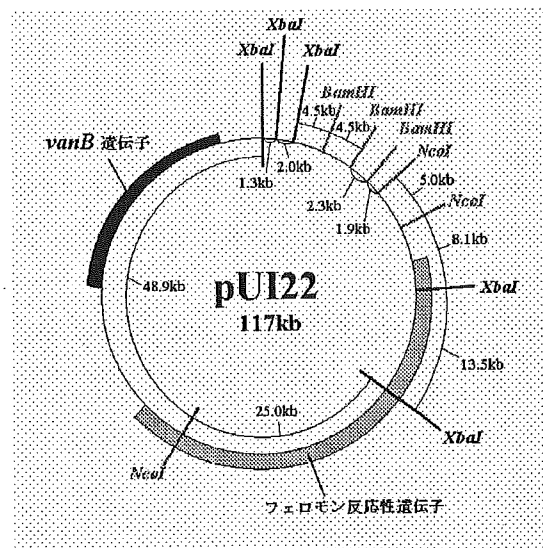


図 1. pUI22 のマップ。DNA の切断に用いた制限酵素は、*Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I, *Xba*I。

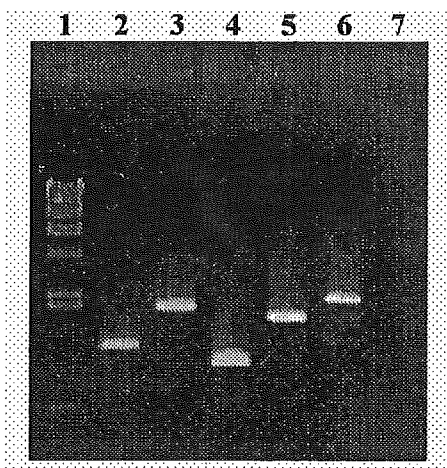


図3. 表2のプライマーを用いたPCRの結果。PCR後の電気泳動の結果を示した。VIの組み合わせでのみ、増幅が行われなかった(lane 7)。Bacteriophage lambdaのDNAをマーカーとして用いた(lane 1)。lane 2、3、4、5、6はそれぞれ順に組み合わせI、II、III、IV、Vである。

vanB オペロンの解析

プラスミドにコードされている *vanB* オペロンクラスターの構造を調べるために、表2に示されるような6種類のプライマーの組み合わせによって pUI22 に PCR を行った。プライマーの設計に当たっては、これまでにわかっている *vanB* オペロンの塩基配列 (図2) を参考とした。³¹ その後、得られた断片それぞれをアガロースゲルで電気泳動したところ図3のような結果が得られた。I~Vの組み合わせではPCRによる遺伝子の増幅がなされたが、VIの組み合わせでは増幅が行われなかった。このことから、図2のIからVまでの領域においてはクラスターの塩基配列が保存されており、*vanXB* の下流で変異または構造変化を起こしていることが推測された。

vanB 遺伝子の存在確認

pUI22 を *Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I, *Xba*I それぞれで切断し電気泳動してみると、図4 (A) の結果が

得られた。*vanB* 遺伝子が得られたプラスミド上にコードされているかどうか、そして存在した場合はその位置を決定するために、このゲルを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。用いた *vanB* 検出用プローブは、pUI22 を V のプライマーの組み合わせで PCR 増幅した DNA 断片である。サザンハイブリダイゼーションの結果は図4 (B) である。いずれのレーンにも発色反応が見られ、pUI22 上には *vanB* 遺伝子がコードされていることがわかった。(図1)

vanB 遺伝子には *VanB1*, *VanB2*, *VanB3* の3つのタイプがあることが知られている。³² そこで、pUI22 上にコードされている *vanB* 遺伝子がどのタイプであるのか決定するために、この *vanB* 遺伝子に対して DNA sequence を行った。その結果 (data not shown) を、すでに知られている *vanB* のタイプ別の配列 (図5)³² と比較すると、pUI22 上にコードされている *vanB* 遺伝子のタイプは *vanB2* であることがわかった。

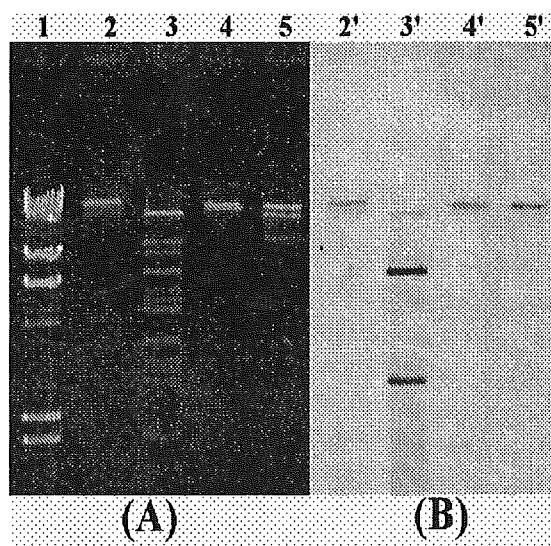


図4. pUI22 の DNA 電気泳動の結果(A)と *vanB* プロブ (*vanB-vanH_B1* と *vanB-vanN_B2*) によるサザンハイブリダイゼーションの結果。用いた制限酵素は、*Bam*HI (lane 2, 2'), *Eco*RI (lane 3, 3'), *Nco*I (lane 4, 4'), *Xba*I (lane 5, 5')であった。Bacteriophage lambda の DNA をマ

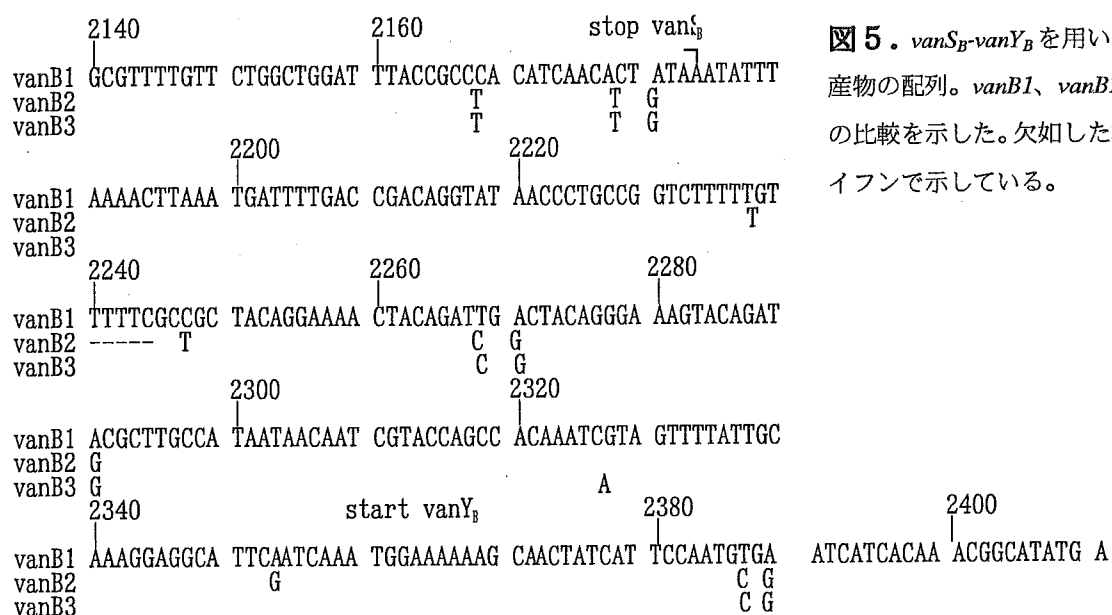


図5. $vanS_B$ - $vanY_B$ を用いての増幅産物の配列。 $vanB1$ 、 $vanB2$ 、 $vanB3$ の比較を示した。欠如した塩基はハイフンで示している。

ーカーとして用いた(lane 1)。

フェロモン反応性プラスミドの存在確認

菌を液体培地にて培養する過程において、自己凝集が肉眼で確認されたことをふまえて、pUI22上にフェロモン反応性の遺伝子があるかどうかを決定するために、pUI22をEcoRIで切った後、アガロースゲル電気泳動で各断片を分離し(図6(A))、そのゲルを用いてサザンハイブリダイゼー

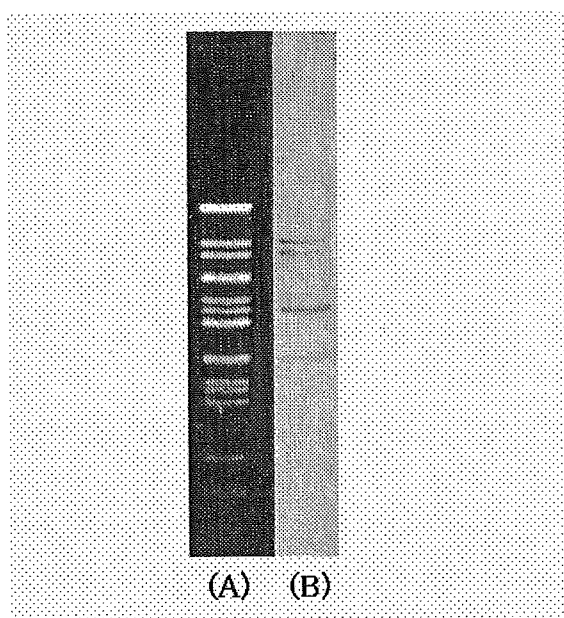


図6. EcoRIを用いて切断されたプラスミド(A)と、pAD1をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼー

ーションにより、フェロモン反応性の遺伝子を検出した結果(B)。

ーションを行った。このときフェロモン反応性遺伝子検出用のプローブとしてpAD1の全プラスミドDNAを用いた。pAD1は、フェロモン反応性のプラスミドとして知られ、その伝達機構も分子レベルで詳しく解析されている。^{14,15,33} ハイブリダイゼーションの結果は図6(B)のとおりであり、発色反応が見られた。これにより、pUI22上にはフェロモン反応性の遺伝子群がコードされていることがわかった。また、図4(B)と図6(B)を比較することで、フェロモン反応性の遺伝子とvanB遺伝子は違う場所にコードされているということもわかった。(図1)

考 察

抗生剤耐性実験の結果から、pUI22にはVCM以外の抗生剤に対する耐性はコードされていないことが推測された。このvanB遺伝子群に対して、複数のプライマーの組み合わせ(表2)によるPCRを行った結果、VIのプライマーVanB-HB1、VanB-NB2の組み合わせでのみ、その増幅がされ

なかった。VのプライマーVanB-WB1, VanB-XB2の組み合わせでは増幅がなされたということと図2から、X_Bの領域の下流において塩基の変異または構造変化が起きていることが考えられる。

また、サザンハイブリダイゼーションの結果から、pUI22にはフェロモン反応性の遺伝子がコードされているということが明らかとなった。これまでもいくつかのフェロモン反応性のプラスミドは報告されており、その遺伝子群の中にフェロモンによる遺伝子の発現を調節するものを含んでいることがわかっている。こうした遺伝子群は各プラスミドの間で相同性がある。^{20,33,34} 今回、菌を培養する過程において、肉眼で判断できるほどの強い自己凝集反応が確認された。このとき、菌は供与菌のみで培養されており、受容菌の分泌する性フェロモンの影響を受けていないはずである。このことは、フェロモン反応を負に調節する遺伝子の領域、*traA* や *traB* などにおいて、なんらかの変異が起こったためと考えられる。^{33,36} この凝集は接合伝達に重要なだけでなく、菌の哺乳類細胞への侵入性に関連しており、*E. faecalis* 株における病原因子の一つであることが報告されている。³⁷

vanB 遺伝子とフェロモン反応性の遺伝子を同時にコードするプラスミドの詳細な構造は、まだ明らかになっていない。このような詳しい解析や実験が、VanB型VREの伝播や院内感染についての理解を深めるために必要である。

文 献

1. Reynolds, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994; 8: 943-950
2. Evers, S., P. Courvalin. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS_B-VanR_B two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 1302-1309
3. Clewell, D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, 1993; 73: 9-12
4. Clewell, D. B. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*, p.349-367. In D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, N.Y., 1993
5. Jett, B. D., M. M. Huyche, M. S. Gilmore. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994; 7: 462-478
6. Schaberg, D. R., M. J. Zervos. Intergenetic and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986; 30: 817-822
7. Dunny, G. M., B. L. Brown, D. B. Clewell. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*; evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 3479-3483
8. Clewell, D. B., Y. Yagi, G. M. Dunny, et al. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J. Bacteriol.*, 1974; 117: 283-289
9. Le Blanc, D. L., L. N. Lee. Physical and genetic analysis of streptococcal plasmid pAM β 1 and cloning of its replication region. *J. Bacteriol.*, 1984; 157: 445-453
10. Evans, R. P., F. L. Macrina. Streptococcal R plasmid pIP501: endonuclease site map, resistance determinant location, and construction of novel derivatives. *J. Bacteriol.*, 1983; 154: 1347-1355
11. Horodniceanu, T., D. Bouanchaud, G. Bieth, et al. R plasmid in *Streptococcus agalactiae* (group

- B). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1976; 10: 795-801
12. Macrina, F. L., G. L. Archer. Conjugation and broad host range plasmids in streptococci, p.313-329. *In* D. B. Clewell (ed.), *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, N. Y., 1993
 13. Clewell, D.B. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol. Rev.*, 1981; 45: 409-436
 14. Clewell, D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, 1993; 73: 9-12
 15. Clewell, D. B. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. Plenum Press, New York, 1993; 349-367
 16. Dunny, G.M., B. L. Brown, D. B. Clewell. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*; evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978; 75: 3479-3483
 17. Dunny, G.M., R.A. Craig, R.L. Carron, et al. Plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*: production of multiple sex pheromones by recipients. *Plasmid*, 1979; 2: 454-465
 18. Ike, Y. R. C. Craig, B. A. White, et al. Modifuzation of *Streptococcus faecalis* sex pheromone after acquisition of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983; 80: 5369-5373
 19. Christie, P.J., G.M. Dunny. Identification of regions of the *Streptococcus faecalis* plasmid pCF-10 that encode antibiotic resistance and pheromone response functions. *Plasmid*, 1986; 15: 230-241
 20. Fujimoto, S., H. Tomita, E. Wakamatsu, et al. Physical mapping of the conjugative bacteriocin plasmid pPD1 of *Enterococcus faecalis* and identification of the determinant related to the pheromone response. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 5574-5581
 21. Ike, Y., D. B. Clewell. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 8172-8177
 22. Ike, Y., D. B. Clewell, R. A. Segarra, et al. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 155-163
 23. Ike, Y., H. Hashimoto, D. B. Clewell. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1987; 25: 1524-1528
 24. Ozawa, Y., K. Tanimoto, S. Fujimoto, et al. Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (*uvr*) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. *J. Bacteriol.*, 1997; 179: 7468-7475
 25. Tanimoto, K., Y. Ozawa, H. Tomita, et al. Cloning and characterization of the *uvr* (ultraviolet resistance) gene on conjugative plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis*. *Dev. Biol. Stand.* 1995; 85: 83-87
 26. Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, et al. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 3585-3593
 27. Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, et al.

- Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* 1997; 179: 7845-7855
28. Kozue Oana, Yoshiyuki Kawakami, Makoto Ohnishi, et al. Molecular and epidemiological study of the first outbreak of vanB type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2001; 54: 17-22
 29. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, et al. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons. Inc., New York. 1987
 30. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989
 31. Evers, S., P. Courvalin. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS_B-VanR_B two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 1302-1309
 32. Kristin, H., G Simonsen, O. Olsvik, et al. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant *Enterococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:1105-1110
 33. Ike, Y., D. B. Clewell. Genetic analysis of the pAD1 pheromone response *Streptococcus faecalis*, using transposon Tn917 as an insertional mutagen. *J. Bacteriol.* 1984; 158: 777-783
 34. Galli, D., A. Friesenegger, R. Wirth. Transcriptional control of sex pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1-encoded) aggregation substance. *Mol. Microbiol.* 1992; 6: 1297-1308
 35. Hirt, H., R. Wirth, A. Muscholl. Comparative analysis of 18 sex pheromone plasmids from *Enterococcus faecalis*: detection of a new insertion element on pPD1 and implications for the evolution of this plasmid family. *Mol. Gen. Genet.* 1996; 252: 640-647
 36. S. Fujimoto, Don B. Clewell. Regulation of the pAD1 sex pheromone response of *Enterococcus faecalis* by direct interaction between the cAD1 peptide mating signal and the negatively regulating, DNA-binding TraA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 6430-6435
 37. Carol L. Wells, Elizabeth A. Moore, Julie A. Helmut Hirt, et al. Inducible Expression of *Enterococcus faecalis* Aggregation Substance Surface Protein Facilitates Bacterial Internalization by Cultured Enterocytes. *Infection and Immunity*, Dec. 2000; 7190-7194

平成15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

β-ラクタム系薬高度耐性化に関与する調節遺伝子の同定と診断法の研究

分担研究者 井上 松久 北里大学医学部微生物・寄生虫学

研究協力者：岡本了一、中野竜一、兼子謙一

グラム陰性桿菌のセフェム系薬に対する耐性化は、それぞれの菌種の染色体上に普遍的に座位する AmpC β-ラクタマーゼ遺伝子発現を調節する複数の遺伝子の変異によって調節されていることが明らかとなっている。そこで *E. cloacae* 由来の AmpC をコードする遺伝子セットをクローニングし、これを *E. coli* K12 株に形質転換させ、代表的なセフェム系薬の *in vitro* 選択により耐性変異菌を分離して詳細に調べた。その結果、得られた変異菌は、調べた限り全て *ampD* 変異であり、DNA 塩基配列の結果変異部位は *ampD* の各部位に点在していた。また、IS の挿入変異株も検出された。すべての株で *ampD* 変異に伴って AmpC 量は増加していた。次いで、野生型 *ampD*⁺ および *ampR*⁺ を用いた相補試験を行ったところ、野生型遺伝子は変異型遺伝子 (*ampD*、*ampR*) に対してそれぞれ優性であり、得られた変異株は *ampD* の共存によってセフェム系薬に対する MIC および AmpC 量共に低下した。そこで、セフェム系薬耐性菌の遺伝子変異を特定できることが判ったことから、この方法を用いて臨床分離セフェム系薬耐性 *E. cloacae* について遺伝子変異の特定を行った。その結果、臨床分離の *E. cloacae* では約 90% の株が、*ampD* 変異がセフェム系薬高度耐性化の要因となっていることが判明した。しかし、一部の耐性菌の中には、*ampR* 変異菌も検出された。

感染症の治療に使用可能な抗菌薬は、経口薬および注射薬を含めると約 150 種を数えるが、その中でもペニシリン系薬、セファロsporin系薬およびカルバペネム系薬を含むβ-ラクタム系薬が患者に処方される抗菌薬の60%弱を占めている。腸内細菌科の菌種など多くのグラム陰性桿菌は染

色体上に AmpC β-ラクタマーゼ産生遺伝子 (*ampC*) および産生調節 *ampR*、*ampD* および *apmG* を保有しているため、β-ラクタム系薬の使い方によってはこれら調節遺伝子の破綻による AmpC β-ラクタマーゼの多量産生による耐性菌が選択される可能性がある。実際、最近のわが国の疫学調査では、*E.*

cloacae の約 30% がセフトキシムやセフトジジムなどの第三世代セフェム薬に耐性を示すことが知られている。

そこで本研究では、グラム陰性菌におけるセファロスポリン系薬高度耐性菌出現の遺伝学的背景を臨床分離の *E. cloacae* をモデルとして解析するとともにその迅速・簡便診断法について検討した。

1. *E. coli* を用いた AmpC 多量産生菌の作成と耐性に関わる遺伝子の同定

E. cloacae 由来の *ampC-ampR* をクローニングしたプラスミド pKU403 を形質転換させた *E. coli* K12 由来の KU3687 株から ABPC, CEZ, CAZ, CFPM, CZOP, AZT の様々な濃度を用いて耐性菌を選択した。その結果、第四世代セフェム薬の CFPM および CZOP を除く抗菌薬では耐性株が 10^{-6} - 10^{-7} の比較的高頻度に耐性菌が選択され、例えば AZT では MIC の 128 の濃度でも 10^{-7} の頻度で耐性菌が選択された (Table 1)。また、耐性株の選択頻度は選択薬剤濃度に依存していた。選択された耐性株の MIC と産生される AmpC の量を Table 2 に示した。選択薬剤にかかわらず耐性株では AmpC 産生量が元株の KU3687 株に比べて約 70 - 1200 倍に増加しており、産生量に伴って β -ラクタム系薬の MIC も上昇していた。

現在提唱されている AmpC の誘導産生機構モデルによると、細胞壁の構成単位であるムロペプチドは AmpG を介して細胞内に取り込まれ、AmpD のアミダーゼ活性で分解されて細胞壁合成に再利用される。一方、細

菌が β -ラクタム系薬の影響を受けると、取り込まれるムロペプチドの量が増加し、AmpD の処理能力を超えるムロペプチドが AmpR に結合して AmpC の転写を増加させると考えられている。このモデルから考察すると、AmpC 多量産生株では、1) *ampR* が変異してムロペプチドが無くても *ampC* の転写を増強させるようになった場合と 2) *ampD* が変異することによりアミダーゼ活性が低下し、結果的に細胞内の蓄積プロペプチド量が増加した場合とが考えられる。そこで、得られた耐性株の変異がいかなる遺伝子に起因するかを調べるために、まず、耐性株から pKU403 を抽出して *E. coli* K12 株に形質転換させてその酵素活性を調べたところ、元株の KU3687 株と同程度に低い産生量であった。このことから、耐性株の変異は、*ampC-ampR* 以外にあると考えられたので、さらに耐性株の *ampD* について変異の有無を検討した。

E. coli K12 由来の *ampD^r* (野生型) をクローニングしたプラスミド pKU420 を耐性変異株 Mut 1-9 に形質転換させて *ampD^r* の共存株を作成した。次いで *ampD^r* の共存系と非共存系の酵素活性を測定し比較したところ、共存系では AmpC 産生量が約 1/1000 に低下した (Fig. 1)。耐性株の耐性化の原因は *ampD* にあることが予想されたことから、これらの *ampD* の塩基配列を決定したところ、変異株 9 株のうち 6 株では Leu 3 Val、Trp 7 Arg、Trp 7 Gly、Leu 38 Gln、Tyr 130 Asp、Arg 161 Leu と AmpD のアミノ酸置換が認められた。さらに 2 株については IS2

が *ampD* 構造遺伝子内と IS5 が直近の上流に挿入されており、残りの 1 株についてはプロモーター領域に変異が認められた。以上のことから、今回 *in vitro* で得られた耐性株はすべて *ampD* の変異であることが判明

した。さらに、野生型 *ampD* は変異型 *ampD* に対して優勢に働くことが明らかになり、この方法を用いると臨床分離セフェム薬高度耐性菌の耐性遺伝子を特定できる可能性が示された。

Table 1 *E. coli* における耐性変異株の選択率

選択薬剤	元株 KU3687 MIC (μg/ml)	の	選択濃度 (μg/ml)	耐性菌選択頻度
ABPC	32	512	(16 MIC)	$< 1.0 \times 10^{-7}$
		256	(8 MIC)	9.6×10^{-7}
		128	(4 MIC)	4.8×10^{-6}
CEZ	32	512	(16 MIC)	$< 1.0 \times 10^{-7}$
		256	(8 MIC)	4.0×10^{-7}
		128	(4 MIC)	2.6×10^{-6}
GAZ	0.12	2	(16 MIC)	2.4×10^{-7}
		1	(8 MIC)	3.6×10^{-7}
		0.5	(4 MIC)	1.1×10^{-6}
CFPM	0.03	0.5	(16 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
		0.25	(8 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
		0.12	(4 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
CZOP	0.06	0.5	(8 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
		0.25	(4 MIC)	$< 4.0 \times 10^{-8}$
AZT	0.06	8	(128 MIC)	3.4×10^{-7}
		4	(64 MIC)	1.4×10^{-6}
		2	(32 MIC)	1.0×10^{-6}

Table 2 耐性変異株の MIC 及び β -lactamase 活性

菌株	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)							酵素活性 (unit/mg)
	ABPC	CEZ	CTM	CAZ	CFPM	CZOP	AZT	
KU 3687	16	2	0.25	0.12	<0.03	0.06	0.06	0.04
Mut 1	>128	>128	>128	32	0.12	0.25	16	64
Mut 2	>128	>128	>128	64	0.25	0.5	32	44
Mut 3	>128	>128	>128	64	0.25	0.5	32	38
Mut 4	16	>128	16	0.5	<0.03	0.06	0.06	3
Mut 5	>128	>128	32	2	<0.03	0.06	1	12
Mut 6	>128	>128	>128	32	0.12	0.12	32	37
Mut 7	>128	>128	128	16	0.12	0.25	8	56
Mut 8	>128	>128	>128	32	0.12	0.25	32	63
Mut 9	>128	>128	>128	16	0.06	0.12	8	40

GET を基質とした

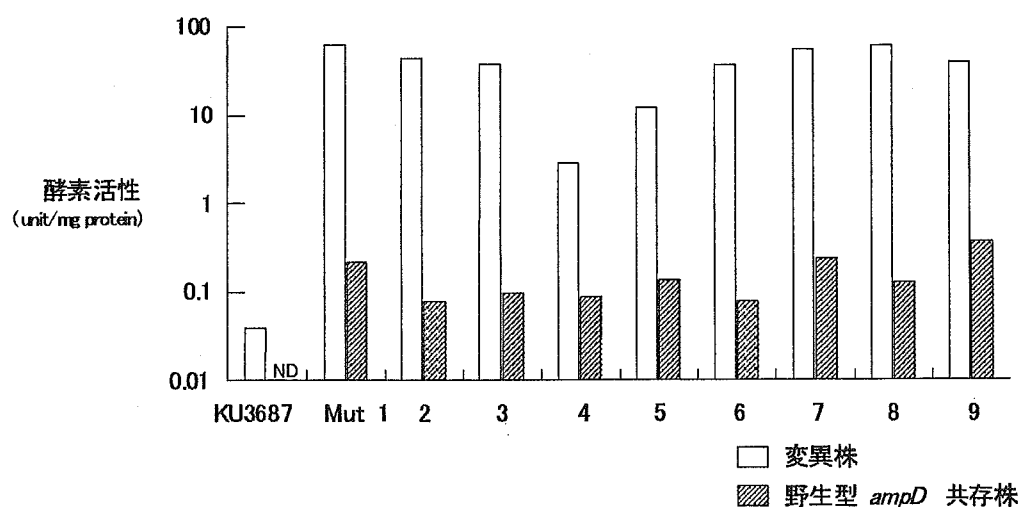


Fig1 変異株に野生型 *ampD* を共存させた時の酵素活性

2. 臨床分離 *E. cloacae* の AmpC 多量産生 に関わる遺伝子の同定

北里大学病院をはじめとした数カ所の病

院から分離されたセフトジジム(CAZ)の MIC が $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の *E. cloacae* 21 株について、CAZ、セフォタキシム(CTX)、アズト

レオナム(AZT)、セフェピム(CFPM)、イミペネム(IPM)のMICを測定するとともにAmpCの産生量を測定した。Table 3に臨床分離株の各種 β -ラクタム系薬のMICを示した。No.4, 18, 20以外の株ではCFPMのMICが比較的低くCAZ, CTX, AZTの耐性化はAmpC多量産生によることが予想された。また、これら3株についてはAmpC以外の酵素産生が疑われた。そこでこれら21株に前項の*E. coli*で行ったと同様に、*E. coli*由来の野生型 *ampD* をもつプラスミド pKU420を形質導入させて共存系を作成し、その酵素産生量を非共存系の場合と比較した。その結果、臨床分離株のpKU420非共存系での酵素活性はおおよそ0.1–30u/mg proteinの範囲に分布したが、pKU420共存系ではNo.11, 18, 20, 21株を除くすべての株で酵素産生量は有意に低下した(Fig.2)。すなわち、臨床分離の*E. cloacae* 21株中18株は明らかに *ampD* の変異によるAmpC多量産生がセフェム薬耐性の原因であると推測された。

野生型 *ampD* の共存により酵素産生量が有意に低下しなかった4株についてさらに詳しく調べた結果、No.11株ではPCRによる同定でToho-1型のESBLをしていることが明らかになったが、クラブラン酸(CVA)により酵素活性が完全には阻害されないことか

ら、背景に *ampD* 以外の変異によるAmpCの多量産生も疑われた。No.20株ではPCRによる同定でIMP型のカルバペネマーゼを産生していることが明らかになった。No.21株では酵素活性がCVAにより阻害を受けることからclass A β -ラクタマーゼを産生していることがわかったが、その種類を同定するには至らなかった。No.18株ではCVAによる阻害反応やPCRによる検索によってもAmpC以外の酵素の産生が否定されたために、*ampD* 以外の変異によるAmpCの多量産生が疑われた。そこで、No.11およびNo.18株について *ampR* のPCRシーケンスを行ったところ、いずれの株を *ampR* に変異が認められた。No.11株では86番目のArgがSerに、No.18株では64番目のThrがIleに変異していた。

以上の結果から、臨床分離のセフェム系薬耐性 *E. cloacae* では、約85%が *ampD* の変異によるAmpC多量産生株であることが推測された。また、*ampR* の変異株も約10%程度存在することが示唆された。しかしながら、少数とはいえ臨床分離菌における *ampR* 変異によるAmpC多量産生菌の出現は、染色体性AmpC β -ラクタマーゼのプラスミド化に大きく関与することが予想されるために注意が必要である。

Table 2 臨床分離 *E. cloacae* に対する β ラクタム系薬の MIC

Strain No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	CAZ	CTX	AZT	CFPM	IPM
1	32	64	16	0.5	0.25
2	16	32	8	0.25	1
3	32	64	16	0.5	0.5
4	>128	>128	>128	8	1
5	16	32	8	0.25	0.25
6	128	64	64	2	0.5
7	>128	>128	>128	4	1
8	64	64	16	1	0.25
9	128	128	32	2	0.5
10	128	128	32	2	0.5
11	32	32	8	0.5	0.5
12	16	16	8	0.25	0.5
13	32	32	8	0.5	0.5
14	32	32	8	0.5	0.5
15	64	128	32	1	0.5
16	64	64	32	2	0.25
17	32	64	32	0.5	0.25
18	128	>128	64	8	0.5
19	32	32	32	0.25	0.25
20	>128	>128	64	128	8
21	64	128	32	1	0.25

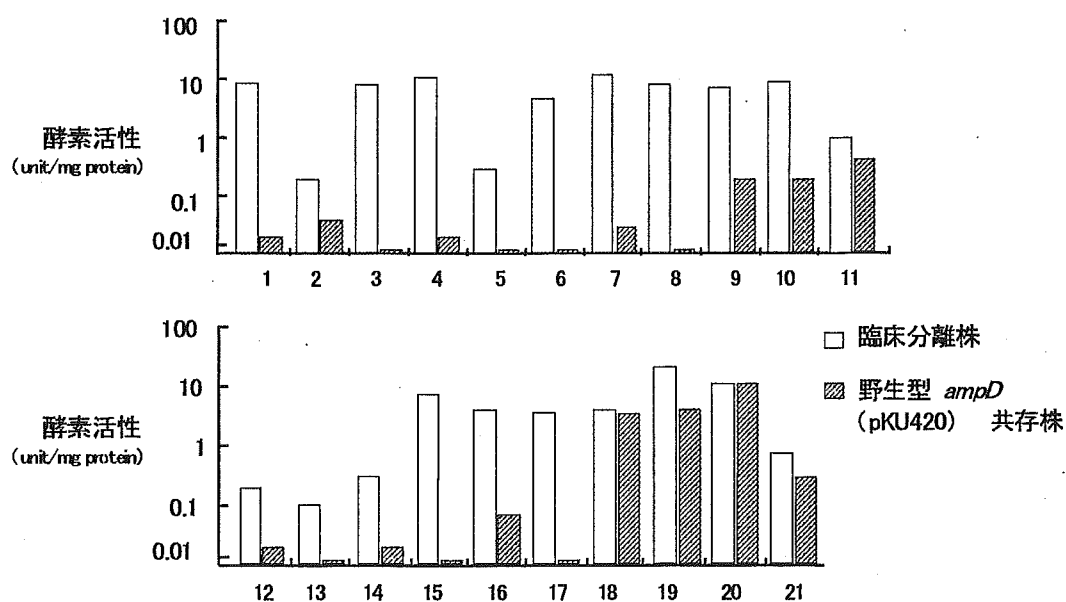


Fig2 臨床分離 *E. cloacae* の β -lactamase 活性

3. プラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼの検索

ヨーロッパを中心にプラスミド性 AmpC β

-ラクタマーゼ産生菌の報告が相次いでいるが、わが国において MOX-1 および CMY-9 が報告されているのみで、未だその報告は

少ない。そこで、*E. coli* および *K. pneumoniae* を標的にセフェム系薬高度耐性菌からプラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼの検索を試みた。

都内の大学病院から分離された *E. coli* KU6400 は、アンピシリン(ABPC)、セファロチン(CET)、セフポドキシム(CPDX)、CTX、AZT、CAZ および CFPM の MIC がそれぞれ >256、>256、>256、64、8、64、0.25 μ g/ml と典型的な AmpC 産生菌の耐性パターンを示した。そこで *E. coli* ML4947 を受容菌として接合伝達したところ、 10^{-5} の頻度でセフェム系薬耐性が伝達された。接合伝達株の酵素産生性を調べたところ、CET を基質として約 10u/mg protein の産生量を示し、基質特性並びに酵素活性が CVA により阻害を受けなかったことから、本プラスミド (pKU601) により産生される酵素は AmpC β -ラクタマーゼが予想された。

そこで pKU601 より β -ラクタマーゼ産生遺伝子をクローニングして塩基配列を解析したところ、そのアミノ酸配列から class C β -ラクタマーゼに特有のモチーフが確認され、しかも *C. freundii* の染色体性 AmpC 産生遺伝子であることが判明したことから、本酵素を CFE-1 と名付けた。さらに興味深いことに、pKU601 は *ampC* 遺伝子の上流に *ampR* 遺伝子を同時に保有していることが明らかになった。*ampR* のシーケンスを行ったところ、135 番目の Asp が Ala に置換されていることが判明した。

通常、グラム陰性桿菌の染色体上の AmpC は *ampD* や *ampR* などの調節遺伝子によって

その産生が調節されるため、産生様式は誘導型であることから、*ampC-ampR* 遺伝子をクローニングしても酵素の産生量は少ない。したがって、染色体上の AmpC 遺伝子がプラスミド化し、十分な形質発現するためには *ampR* の変異など酵素を多量に産生し得る変化が必要となる。今回検出した CFE-1 産生遺伝子では、*C. freundii* の染色体上の遺伝子のうち、まず *ampR* に変異が生じて AmpC が多量に産生されるようになった後にプラスミド化した可能性が示唆される。前項の臨床分離 *E. cloacae* の AmpC 多量産生菌の遺伝背景を調べたところ、約 10% に *ampR* に何らかの変異が認められたことは、AmpC 遺伝子のプラスミド化に繋がる可能性もあるため、かかる菌株の迅速な診断法が必要となる。

研究成果

1. Matsuoka M, Inoue M, Endo Y, Nakajima Y. Characteristic expression of three genes, *msr(A)*, *mph(C)* and *erm(Y)*, that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 220(2): 287-93, 2003.
2. Kaieda S, Okitsu N, Yano H, Hosaka Y, Nakano R, Okamoto R, Takahashi H, Inoue M. Induction of telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 52(4): 736-731, 2003.
3. Nagano N, Sato J, Cordevant C, Nagano

Y, Taguchi F, Inoue M. Presumed Endocarditis caused by BRO β -lactamase-producing *Moraxella lacunata* in an infant with Fallot's Tetrad. J Clin Microbiol. 41(11): 5310-5312.

4. Inoue M, Lee NY, Hong SW, Lee K,

Felmingham D. PROTEKT 1999-2000: a multicentre study of the antibiotic susceptibility of respiratory tract pathogens in Hong Kong, Japan and South Korea. Int J Antimicrob Agents. 23(1): 44-51, 2004.

平成 15 年度分担研究報告書

分担研究課題：呼吸器感染症からの検査材料を用いた直接 PCR による原因菌の迅速検
索法の確立

分担研究者：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）

〔研究要旨〕呼吸器感染症における原因微生物の網羅的検索を目的として，原因菌となる確率の高い6種の微生物に対する PCR 法での同時・迅速診断法の確立をめざした。目的菌は，①肺炎球菌，②インフルエンザ菌，③A 群溶血レンサ球菌，④マイコプラズマ菌(*M.pneumoniae*)，⑤レジオネラ菌(*L.pneumophila*)，⑥クラミジア菌(*C.pneumoniae*)である。新たな方法での結果を得るまでの所要時間は，2～2.5 時間に短縮できた。この方法を小児・呼吸器感染症の検査材料を用いて実施し，培養よりも高い精度であることを証明した。

2.5 時間で起炎菌の結果が得られることは，肺炎例等に対し，入院 24 時間以内に最も適切な抗菌薬へと変更することが可能であること，外来症例においては再診時において，抗菌薬の適否も含めて判断できることが明らかにできた。ここで述べた PCR 法の臨床への導入は，患者のみならず，医療経済効果の視点からも，極めて有用であると結論された。

研究協力者：

小林 玲子，諸角 美由紀，長谷川 恵子，千葉 菜穂子，鈴木 悦子(北里大学北里生命科学研究所，感染情報学研究室)

砂川 慶介(北里大学医学部感染症学講座)

研究目的

呼吸器感染症の起炎菌となる得る頻度の高い微生物において，さまざまな薬剤に対する耐性化

が急速に進行し，難治例や重症感染症例が多くなっている。このような背景には，外来患者に対して，適正とは言えない抗菌薬が細菌検索を施行することなく empiric に使われていることがひとつの要因になっていると考えられる。耐性菌の増加を抑えるには，empiric に行われる化学療法ではなく，evidence に基づいた化学療法 (Evidence Based Chemotherapy: EBC) を行うことが必要である。結果的にはこの考え方の根付くことが，医療