

## 【原著・基礎】

## 腸内細菌科菌種におけるメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出

角田 光子<sup>1)</sup>・佐竹 幸子<sup>2)</sup>・伊豫部志津子<sup>1)</sup><sup>1)</sup>群馬大学医学部薬剤耐性菌実験施設\*<sup>2)</sup>同学部 保健学科

(平成10年9月30日受付・平成11年1月11日受理)

メタロβ-ラクタマーゼは、カルバペネム薬をはじめとして、モノバクタム類を除く既存のすべてのβ-ラクタム薬を水解するカルバペネマーゼであり、この遺伝子 *bla<sub>IMP</sub>* は緑膿菌においてはじめて伝達性プラスミドに見出された。遺伝子 *bla<sub>IMP</sub>* が他菌種に広がる可能性を予測して、imipenem (IPM) 耐性腸内細菌科菌種についてその検出を試みた。遺伝子は polymerase chain reaction (PCR) 法により検出し、加えてカルバペネマーゼの産生を菌細胞粗抽出液による IPM 分解活性を測定することにより確認した。PCR 法による *bla<sub>IMP</sub>* 陽性株はすべて IPM を水解した。菌種別に設定した IPM 耐性菌あたりの、*bla<sub>IMP</sub>* 検出株数は以下の通りであった。*Enterobacter cloacae*: 6/56, *Escherichia coli*: 1/8, *Citrobacter freundii*: 1/17, *Morganella morganii*: 1/5, *Serratia marcescens*: 4/10。耐性菌あたりの検出率をもっとも高いのは、*S. marcescens* であった。得られたすべての *bla<sub>IMP</sub>* 保有株について、*E. coli* K-12 株を受容菌として IPM 耐性の接合伝達実験を行ったところ、*E. cloacae* 6 株中 4 株からメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子の伝達が証明され、*bla<sub>IMP</sub>* が伝達性プラスミドにあることが示唆された。

**Key words:** メタロβ-ラクタマーゼ

β-ラクタマーゼは、病原菌のβ-ラクタム薬耐性化の重要な要因である。特に基質域の広いβ-ラクタマーゼを産生する細菌に対しては、多種類のβ-ラクタム薬が効力を失う<sup>1)</sup>。カルバペネム薬を効率よく水解するカルバペネマーゼには、活性に亜鉛を要求するメタロβ-ラクタマーゼがあり、カルバペネム類に加えて、ペニシリン類およびcefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ) などを含むセフェム類を水解するために問題視されている<sup>2-4)</sup>。わが国ではじめて、緑膿菌において伝達性 imipenem (IPM) 耐性がプラスミドにコードされていることが報告されて以来<sup>5)</sup>、メタロβ-ラクタマーゼは IPM, CAZ 耐性緑膿菌から検出され、これらの菌の院内での伝播の例も報告されている<sup>6-9)</sup>。一方、*Serratia marcescens* からメタロβ-ラクタマーゼは検出され、あるものはプラスミド性であることが証明された<sup>10-12)</sup>。緑膿菌のメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子は、その塩基配列が *S. marcescens* のものとまったく同じであり、さらに腸内細菌科の菌種でも発現することがわかり、同じ遺伝子 (*bla<sub>IMP</sub>*) がプラスミドを介して広くグラム陰性桿菌菌種間に広がることが予想された<sup>13,14)</sup>。遺伝子の塩基配列からプライマーを作製し、PCR (polymerase chain reaction) により *bla<sub>IMP</sub>* を検出する方法を用いることにより、緑膿菌以外の種々の菌種においてメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子が検出されはじめて<sup>15)</sup>。

われわれは、IPM 耐性腸内細菌科菌種について、PCR 法に加えてβ-ラクタマーゼ活性を測定することによりメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子保有菌を検出し、新たに *Enterobac-*

*ter cloacae* において伝達性メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子の伝播を見出した。

## I. 材料と方法

## 1. 使用菌株

1996年10月から1997年4月の間に、東京、神奈川、群馬の3か所の病院細菌検査室より分与された CAZ 耐性腸内細菌科菌種を用いた。これらの菌株について、寒天平板希釈法にて IPM の MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) を測定、感受性分布図を参照とし、感受性群の MIC より高い濃度の IPM 含有培地に生育する菌を耐性菌として選び検査対象とした<sup>16)</sup>。調べた菌株数と選択に用いた IPM の MIC は以下の通りである。*E. cloacae*, 56 株 ( $\geq 0.39$ ); *Escherichia coli*, 8 株 ( $\geq 0.78$ ); *Citrobacter freundii*, 17 株 ( $\geq 0.78$ ); *Morganella morganii*, 5 株 ( $\geq 3.13$ ); *Serratia marcescens*, 10 株 ( $\geq 3.13$ )。

伝達性プラスミド検出に用いた受容菌は、*E. coli* K-12 ML 4901 (nalidixic acid, NA, 耐性) および *E. coli* K-12 ML 4905 (rifampicin, RFP, 耐性) である。

## 2. 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

日本化学療法学会標準法にもとづき、寒天平板希釈法にて測定した<sup>17)</sup>。培地としては、感性ディスク用培地-N (ニッスイ) および感受性測定用ブイヨン (ニッスイ) を用いた。測定のための菌数は、1 スポット (5  $\mu$ ) あたり  $10^4$  のオーダーに調整した。

## 3. メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出

PCR法によった。菌は100°C、5分煮沸しTemplateとした。PrimerはSendaらの設定したメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子検出プライマーを用いた<sup>15)</sup>。PCRにはPremix Taq試薬(タカラ)を用い、94°C、1分(変性)、55°C、1分(アニーリング)、72°C、1.5分(ポリメラーゼ反応)、を25サイクル、および72°C、7分の追加、の過程で遺伝子内の587bp DNAを増幅した。増幅断片はアガロースゲル電気泳動にて検出した。

#### 4. β-ラクタマーゼ活性の測定

酵素活性の測定法は前述の方法によった<sup>9)</sup>。すなわち、L-ブロス中振とう培養菌細胞を超音波にて破碎し、その遠心上清を粗酵素液として、β-ラクタマーゼ活性をUV法にて測定した。30°C、1分間に1μモルの基質を分解する酵素量を1unitとした。比活性は単位蛋白あたりの分解活性(unit/mg protein)で示した。

#### 5. プラスミドの検出

接合伝達実験は、メンブランフィルター法にて行った<sup>18)</sup>。伝達株の選択にはCAZ 6.25 μg/mlおよびNA(またはRFP) 100 μg/mlを加えた寒天平板を用いた。

## II. 結 果

### 1. PCR法によるメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出

調べたIPM耐性株はすべて異なる患者由来である。これらについて、メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子保有菌株をPCR法で調べたところ、すべての菌種から587bpのPCR断片を生ずる株が検出され、遺伝子保有菌の存在が判明した(Fig.1)。検査株数あたりのメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子保有株数は、*E. cloacae*: 6/56(11%)、*E. coli*: 1/8、*Citrobacter freundii*: 1/17(6%)、*Morganella morganii*: 1/5、*S. marcescens*: 4/10(40%)

であり、耐性菌あたりの検出率をもっとも高いのは、*S. marcescens*であった。

### 2. メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子陽性株の性状

PCR法によりメタロβ-ラクタマーゼ遺伝子が検出された株はすべてIPM水解活性を示した(Table 1)。いずれの株もCAZ, CTX, およびampicillin (ABPC)に耐性であり、特に*E. cloacae*と*S. marcescens*はCAZに高い耐性を示した。これらの株におけるIPMについての耐性レベルと水解活性をみると、MICのもっとも低い*C. freundii*では水解活性も低く、*E. coli*, *M. morganii*でもMIC、水解活性は共に低かった。*E. cloacae* 6株においては、MICの高いものほどIPMの水解活性が高い傾向にあった。特にMIC: 12.5 μg/mlを示した1株ではもっとも高い水解活性が見られた。水解比活性が0.18~3.26 (u/mg protein)の範囲にある*E. cloacae*のMICは3.13~12.5 μg/mlであったが、一方、水解比活性が0.19~1.56 (u/mg protein)の範囲にある*S. marcescens*におけるIPMのMICは100 μg/ml以上といずれも高く、水解比活性とMICとの関係は菌種間では異なっていた。

### 3. IPM耐性の伝達

得られたメタロβ-ラクタマーゼ産生株すべてについて、遺伝子 $bla_{IMP}$ の接合による伝達性を調べた。伝達の耐性マーカーとしては、 $bla_{IMP}$ 遺伝子のコードする耐性のうち高い耐性度の得られるCAZ耐性を用いた。受容菌である大腸菌の選択マーカーとしては、NA耐性を用いたが(受容菌: ML 4901)、NA耐性であった*E. cloacae*の2株に対してはRFP耐性を用いた(受容菌: ML 4905)。耐性伝達株をCAZとNA(またはRFP)を含む寒天平板で選択したところ、*E. cloacae* 4株から受容

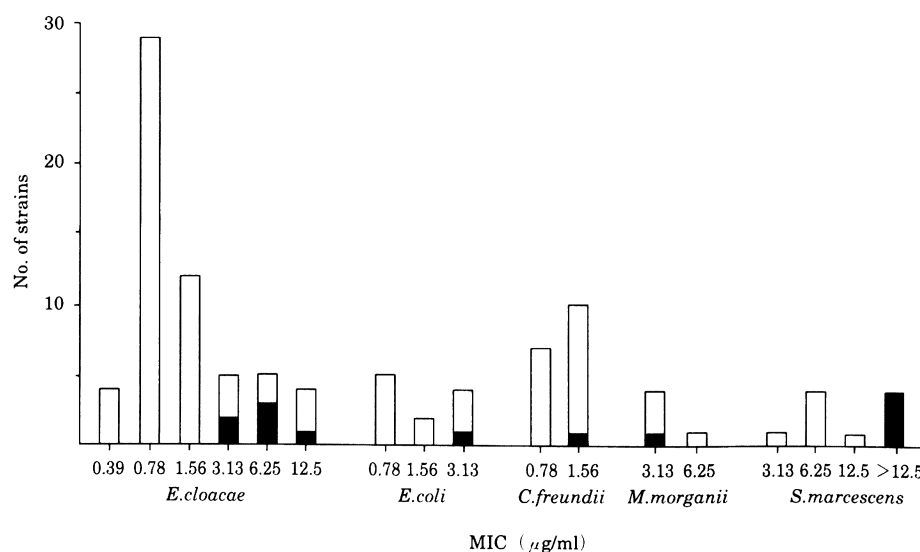


Fig. 1. Detection of the metallo-β-lactamase gene among imipenem (IPM)-resistant strains of Enterobacteriaceae.

Open boxes indicate the number of IPM-resistant strains with different MICs. Black boxes indicate the number of metallo-β-lactamase gene positive strains.

菌あたり約  $10^{-5}$  の頻度で CAZ 耐性の伝達をみた。その他の株からは、CAZ 耐性の伝達は認められなかった (伝達頻度:  $<10^{-8}$ )。Table 2 に示すように、伝達株はいずれのもの、IPM, CAZ, CTX, ABPC, に同時に耐性化しており、PCR 法により *bla*<sub>IMP</sub> 陽性であることが確認され (データ省略) かつ IPM 水解性を獲得していた。すなわち、メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子は伝達性であることから、プラスミド性であると推定された。IPM 水解活性と cephaloridine (CER) 水解活性の比率をみると、伝達株ではほぼ 1 であり、メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子のみが伝達したことを示している (Table 2)。この比率はプラスミドのドナーである *E. cloacae* では 0.14 以下と低いが、*E. cloacae* がメタロβ-ラクタマーゼに加えて菌種固有のセファロスポリナーゼを産生しているた

めと解釈された<sup>2)</sup>。

### III. 考 察

メタロβ-ラクタマーゼは、その広い基質域が示すように、病原細菌に対して IPM, CAZ をはじめとするほとんどのβ-ラクタム薬に耐性を付与する。しかも従来のβ-ラクタマーゼ・インヒビター (sulbactam, clavulanic acid, tazobactam) による阻害を受けない。したがって、特に緑膿菌のように有効な抗菌薬に限りのある菌種に対しては、メタロβ-ラクタマーゼによる耐性化は脅威となる。この遺伝子 *bla*<sub>IMP</sub> が *P. aeruginosa*, *S. marcescens* においてプラスミドに存在することはまた、外来性遺伝子として多くの菌種に広がる可能性を示唆するものである。

緑膿菌の遺伝子 *bla*<sub>IMP</sub> をクローニングし種々の腸内細

Table 1. Detection of metallo-β-lactamase producing strains

Strain	Source	MIC. (μg/ml)				IPM-hydrolyzing activity. (u/mg protein)
		IPM	CAZ	CTX	ABPC	
<i>C. freundii</i> CF 38	urine	1.56	100	25	>800	0.02
<i>E. cloacae</i> ENC 19	pus	6.25	>100	>100	>800	0.70
<i>E. cloacae</i> ENC 131	urine	6.25	>100	>100	>800	0.71
<i>E. cloacae</i> ENC 132	drain	3.13	>100	>100	>800	0.55
<i>E. cloacae</i> ENC 156	sputum	12.5	>100	>100	>800	3.26
<i>E. cloacae</i> ENC 162	drain	6.25	>100	>100	>800	0.78
<i>E. cloacae</i> ENC 909	sputum	3.13	>100	>100	>800	0.18
<i>E. coli</i> EC 5	pus	3.13	25	12.5	50	0.06
<i>M. morgani</i> MM 64	sputum	3.13	50	25	800	0.10
<i>S. marcescens</i> SM 10	urine	>100	>100	>100	>800	0.19
<i>S. marcescens</i> SM 11	urine	>100	>100	>100	>800	0.19
<i>S. marcescens</i> SM 12	urine	>100	>100	>100	>800	0.21
<i>S. marcescens</i> SM 905	urine	>100	>100	>100	100	1.56

IPM: imipenem, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, ABPC: ampicillin

Table 2. Transferable plasmids mediating metallo-β-lactamase

Strain	MIC (μg/ml)				Specific activity (u/mg protein)		IPM/CER
	IPM	CAZ	CTX	ABPC	IPM	CER	
ENC 19	6.25	200	>800	>800	0.70	8.71	0.08
Plasmid 19/ML 4905	3.13	200	400	100	0.28	0.28	1.00
ENC 132	3.13	>200	>800	>800	0.55	3.89	0.14
Plasmid 132/ML 4905	6.25	>200	200	100	0.87	0.85	1.02
ENC 131	6.25	>200	>800	>800	0.71	10.10	0.07
Plasmid 131/ML 4901	6.25	200	200	200	0.55	0.58	0.94
ENC 162	6.25	>200	>800	>800	0.78	8.79	0.09
Plasmid 162/ML 4901	6.25	200	400	400	0.50	0.50	1.00
<i>E. coli</i> ML 4901	0.39	<0.2	<0.2	3.13	<0.01	<0.01	
<i>E. coli</i> ML 4905	0.39	<0.2	<0.2	3.13	<0.01	<0.01	

IPM: imipenem, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, ABPC: ampicillin, CER: cephaloridine

菌科菌種での発現をみたところ、耐性発現のレベルは菌種ごとに異なっていた<sup>13)</sup>。すなわち、IPMのMIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) でみると、*E. coli*: 0.78, *C. freundii*: 3.13, *E. cloacae*: 6.25, *S. marcescens*: 25となっていた。同じ遺伝子を保有していても、IPMの外膜透過性などの要因、その他の宿主菌の性状が、MIC値に影響するものと推定される。今回、メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子検出を目的として、IPM耐性菌選択のブレイクポイントを菌種ごとに遺伝学的に設定したのは、この点を考慮に入れたものである。また、 $\beta$ -ラクタマーゼを産生する株については、酵素の活性が強いほど培地中の $\beta$ -ラクタム薬の濃度が低下し、見かけ上MIC値が高くなることを考慮して、少ない菌量でMICを測定した。すなわち、IPM耐性腸内細菌全般に対して、NCCLSによるブレイクポイント $\geq 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ の設定は、*bla*<sub>IMP</sub>保有菌の特定のためには妥当ではない。*S. marcescens*以外の菌種ではそれ以下のMICを示す菌から*bla*<sub>IMP</sub>が検出されるからである。

広く病原細菌を調べた報告では、緑膿菌以外のグラム陰性桿菌で、メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子が検出された菌種としては、*S. marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *C. freundii*, などの腸内細菌科の菌種とブドウ糖非発酵菌菌種があげられる<sup>15,19)</sup>。*K. pneumoniae*においてもプラスミド性遺伝子が見出され、この塩基配列は緑膿菌の遺伝子と一致しており、すなわち*bla*<sub>IMP</sub>であることが証明されている<sup>2)</sup>。

今回われわれは、上記の腸内細菌科菌種に加えて、さらに*E. cloacae*, *E. coli*, *M. morgani* から新たにメタロ $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子*bla*<sub>IMP</sub>を検出した。*bla*<sub>IMP</sub>保有株のすべてがIPMを水解することも確認した。さらに*E. cloacae* 6株中4株から伝達性メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子が検出され、これらはプラスミド性であると推定される。4株のうち3株は、他の1株(ENC 162)とは異なる同一病院から分離されており、異なる患者由来であるが同じ株である可能性は否定できない。

メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子*bla*<sub>IMP</sub>は、カセットとして異なるプラスミドに挿入しうることが、*P. aeruginosa*と*S. marcescens*の例で証明されている<sup>10,14)</sup>。腸内細菌科菌種では、IPMのMICが1.56~3.13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下と低い株から*bla*<sub>IMP</sub>が検出されたが、これらの株は、その他の $\beta$ -ラクタム薬に対しては耐性であり、CAZ, CTX, もしくはABPCの存在下でも生存しうる、遺伝子*bla*<sub>IMP</sub>カセットのreservoirとなる。すなわち、*bla*<sub>IMP</sub>カセットを挿入したプラスミドが、*P. aeruginosa* または*S. marcescens* に伝達し、高いIPM耐性を付与する可能性がある。また*P. aeruginosa* においては、*bla*<sub>IMP</sub>をもつ伝達性プラスミドを保有する株による、患者間の伝播の例が報告されている<sup>6,7)</sup>。これらの事実は、メタロ $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子が、伝達性プラ

ズミドを介して菌種間に広がることを示唆し、またこのようなプラスミドを保有する株が患者間で伝播しうることを意味するものである。

#### 謝 辞

この論文は第44回日本化学療法学会東日本支部総会において発表したものを一部修正したものです。当誌への投稿を推薦して下さった座長の大屋哲博士および本誌編集委員会に感謝いたします。本研究は文部省科学研究費(課題番号90008313)によるものです。

#### 文 献

- 1) Jacoby G A, Medeiros A A: More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1697~1704, 1991
- 2) Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A: A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1211~1233, 1995
- 3) Livermore D M: Acquired carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 673~676, 1997
- 4) Rasmussen B A, Bush K: Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 223~232, 1997
- 5) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al.: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 147~151, 1991
- 6) Minami S, Akama M, Araki H, et al.: Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids for class B  $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 37: 433~444, 1996
- 7) 南新三郎, 赤間美穂, 伊豫部志津子, 他: 同一病棟より継続的に分離されたプラスミド性 Class B  $\beta$ -lactamase産生緑膿菌に関する研究。日化療会誌 44: 199~212, 1996
- 8) Matsumoto T, Kumazawa J, Nagayama A: Sensitivities to four carbapenems of bacteria isolated from patients with refractory complicated urinary tract infections and the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 322~324, 1996
- 9) Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, et al.: Multifocal outbreaks of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams, including carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 349~353, 1996
- 10) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, et al.: Molecular characterization of an Enterobacterial metallo  $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 71~78, 1994
- 11) Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, et al.: Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>IMP</sub> among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 824~829, 1995
- 12) Marumo K, Takeda A, Nakamura Y: Purification

- and characterization of metallo  $\beta$ -lactamases from *Serratia marcescens*. *Microbiol. Immunol.* 39: 27~33, 1995
- 13) Iyobe S, Tsunoda M, Mitsunashi S, et al.: Cloning and expression in Enterobacteriaceae of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 175~180, 1994
- 14) Iyobe S, Minami S, Yamada H: Insertion of a carbapenemase gene cassette into an integron of a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 1114~1115, 1996
- 15) Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, et al.: PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*bla<sub>IMP</sub>*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2909-2913, 1996
- 16) 布施愛索, 小柏美恵子, 井上松久, 他: Imipenem/Cilastatin sodium (MK-1787/MK-0791) に関する細菌学的検討。 *Chemotherapy* 33 (S-4): 1~13, 1985
- 17) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。 *Chemotherapy* 29: 76-79, 1981
- 18) 伊豫部志津子, 寺門誠致: Rプラスミドの接合伝達と分類。Rプラスミドの分子遺伝学的実験法 (日本細菌学会教育委員会編), P.8~16, 菜根出版, 東京, 1983
- 19) Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi, T, et al.: Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2006~2011, 1998

### Detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene in clinical strains of Enterobacteriaceae

Mitsuko Tsunoda<sup>1)</sup>, Sachiko Satake<sup>2)</sup> and Shizuko Iyobe<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory of Drug Resistance in Bacteria, <sup>2)</sup>School of Health Science; Gunma University School of Medicine, 3-39-22, Showa-machi, Maebashi, Japan

Metallo- $\beta$ -lactamase is a carbapenemase identified first in a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid which has a broad substrate specificity, including all  $\beta$ -lactams except monobactams. Anticipating dissemination of the gene *bla<sub>IMP</sub>* among other clinical strains of gram-negative bacteria, especially Enterobacteriaceae, we attempted to detect the gene using a polymerase chain reaction (PCR) technique and then measured  $\beta$ -lactamase activity. The number of *bla<sub>IMP</sub>* positive strains per imipenem (IPM)-resistant strain tested was as follows: *Enterobacter cloacae*: 6/56, *Escherichia coli*: 1/8, *Citrobacter freundii*: 1/17, *Morganella morganii*: 1/5, and *Serratia marcescens*: 4/10. The highest frequency of *bla<sub>IMP</sub>* detected was found in *S. marcescens*. Transmissible plasmids bearing *bla<sub>IMP</sub>* were identified in four of the six *E. cloacae* strains.