

## 【総説】

# 今日のマクロライド系抗菌薬の耐性化の傾向

小原 康治

千葉大学薬学部微生物薬品化学研究室\*

(平成 11 年 11 月 26 日受付・平成 12 年 2 月 24 日受理)

臨床分離株におけるマクロライド抗生物質耐性に関して、30 年前には、単純に (1) 70 S リボソームの 50 S サブユニット中の 23 SrRNA の特定アデニンが N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-ジメチル化酵素によって修飾されるために、マクロライド抗生物質が結合できなくなって耐性化するとだけ覚えておけば十分であった。しかし、現在ではエリスロマイシンから始まった種々のマクロライド開発によってマクロライド耐性化機構は実に多様化し、激しく進化してきている。そして、最近の遺伝子工学を駆使した研究の進歩と共に、アデニン 2058 位 N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-ジメチル化反応機構の詳細や種々の新しい耐性化機構が明らかとなってきた。さらに、(2) 23 SrRNA の多部位での残基変異、(3) リボソーム 50 S サブユニットのリボソーム蛋白変異や、他に (4) マクロライド排出系蛋白、(5) マクロライド透過性変化、(6) エリスロマイシンエステラーゼ (エリスロマイシンエステル環加水分解不活化酵素)、(7) マクロライド 2'-リン酸化不活化酵素、(8) マクロライド 2'-グリコシル化による不活化機構や、(9) マクロライドホルミル基 (CHO) 還元化機構、(10) マクロライドの脱アシル化耐性化機構が知られている。これらの中にはいくつものサブグループが知られ、かつ、菌株によって特異性をもっている。このような多種類のマクロライド耐性化機構が出現し問題化している現状下でそれぞれ特徴をもつ新たなマクロライドである 15 員環マクロライドのアジスロマイシン、14 員環マクロライド誘導体のケトライドなどの登場が予想されており、新マクロライドと耐性菌の戦いがいま再びはじまろうとしている。そして、今後のマクロライド耐性菌はさらに新しい進化を余儀なくされていくに違いない。

**Key words:** マクロライド抗生物質、耐性、N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-ジメチル化酵素、エリスロマイシンエステラーゼ、マクロライド 2'-リン酸化不活化酵素

マクロライド (ML) 薬は 12~16 員環ラク톤にジメチルアミノ糖や中性糖がグリコシド結合した構造を持つ一群の抗生物質の総称である。*Saccharopolyspora erythrae* から 14 員環のエリスロマイシン (EM) が発見され、1950 年代に初めて臨床的に登場して以来、医療において大変信頼され約半世紀にわたって用いられている。抗菌範囲は中程度であるが ML 薬は、肺への移行性にすぐれ特にグラム (+) 球菌などによる呼吸器感染症や、リケッチア、クラミジアおよび肺炎マイコプラズマ感染症にも有効であるという優れた特色をもっている。一方、グラム (-) 菌に対しては球菌などの一部のみにも有効で、ほとんど無効とされてきた。それは ML 薬がグラム (-) 菌細胞表層を通過できないと説明されてきたのが理由である。しかしながら最近では ML 薬はグラム (-) 菌では外膜を通過した後、ML 排出機構によって菌体内濃度を低下させて耐性化していると考えられている<sup>1,2)</sup>。

さきのように ML 薬は主として *Staphylococcus aureus* などのグラム (+) 菌感染症に対して広く用いられてきた治療薬であることから、*S. aureus* に関する ML 耐性の研究が盛んに行われ ML の作用点や ML 耐性に関しては現在

までに優れた総説がいくつも書かれている<sup>3-12)</sup>。

近年、日本では慢性気管支炎、気管支拡張症やびまん性汎細気管支炎などの慢性下気道感染症や慢性副鼻腔炎にエリスロマイシン (EM)、ロキシスロマイシン (RXM)、クラリスロマイシン (CAM) など 14 員環 ML の少量長期投与療法<sup>13-15)</sup>が行われ、その有効性が報告され<sup>16)</sup>、また、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) が起因している症例でも有効性が報告されている。その新しい使用法が注目され、次々と ML 薬の新生理作用が見い出され解析されつつある<sup>17-32)</sup>。1999 年にはアメリカでの肺嚢胞性線維症 (cystic fibrosis<sup>33)</sup>) 患者に対する 15 員環 ML のアジスロマイシン (AZM) の有効性も報告されている<sup>34,35)</sup>。これらを背景に、ML の使用量が年々増加していることから、新たな ML 耐性菌の出現が心配されている。

一方で、いままでに多くの ML 誘導体の研究がなされてきている<sup>36-39)</sup>。その ML 誘導体の分類は研究者によって少し異なっている。はじめに登場した EM を筆頭に、オレアンドマイシン (OL) などの 14 員環 ML を第一世代とすると、これらの使用により臨床分離ブドウ球菌において誘導型マクロライドーリンコサミドーストレプトグラミン B

(MLSもしくはMLS<sub>B</sub>)耐性を生じてしまった。第二世代といわれる16員環ML(ロイコマイシン, ジョサマイシン, スピラマイシン (SPM), ミデカマイシン, ミオカマイシンなど)の登場で, 構成型MLSタイプやML排出タイプの耐性を生じた。ここにロキタマイシンを含める人もいるが, 他と比べて殺菌性や抗菌範囲が広がっているためニューMLに含める人もいる。1980年頃, 緑膿菌に有効でグラム(+)菌に弱抗菌性の第3世代セフェムの乱用により薬剤耐性グラム(+)球菌などが再興してきて,  $\beta$ -ラクタム剤が無効なグラム(+)菌, 嫌気性菌, レジオネラ, クラミジア, マイコプラズマ, およびキャンピロバクターなどの病原微生物が問題化した。そこで, これらに有効であったMLが再注目された。さらに, 1980年代後半から, 第三世代(ニューML)と呼ばれる胃酸安定型MLのロキタマイシン(1986年発売), RXMやCAM(1991年発売)が登場し, 急性上気道感染症や肺炎に8割以上の有効性を示した。そして, 1996年アメリカ微生物学会の世界抗菌剤売上高調査ではMLは第三位(11.4%)を占めるほど重要な抗菌剤となった<sup>12)</sup>。

これら, より広範囲抗菌スペクトル化した酸安定型半合成ML薬の使用により, *Mycobacterium* spp. と *Helicobacter pylori* の耐性変異株が生じた。そして, いまでは近々登場が予想されている酸安定型で, 白血球への取り込みが優れ, 投与回数や投与日数が少なくすむAZMと, 今後が期待されている誘導型MLS型耐性株に有効なケトライドが注目されている。

現在, 新たな抗生物質開発の力が弱まっているなかで, ML薬は今後ますます改良され使用量が増えて行くことが予想される。

ヨーロッパにおいてはMLの信頼性が高いことや日本と健康保険制度が異なることから, EMは免疫不全症患者の敗血症や旅行者下痢症の治療薬や予防薬として, また血液学・腫瘍学病棟における長期経口投与による腸内細菌や病原細菌の排除にも用いられている<sup>40-42)</sup>。日本ではMLは主にグラム(+)菌感染症に使用されているが, その40~50%はEM耐性といわれ, MRSAではほとんどがML耐性化している<sup>43)</sup>。

前述のようにML耐性機構の解析は一昔前まではML耐性 *S. aureus* を用いてほとんどが解析されている。しかし, 1988年ごろに大腸菌由来のEMエステラーゼやマクロライド2'-リン酸化不活化酵素(MPH(2'))が相次いで発見された。このML高度耐性大腸菌の出現はMLが経口投与で使われていることに他ならない。

MLの経口投与時の血中濃度は数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ くらいであるので, グラム陰性菌には無効となるが, EMの腸管内濃度は1,000 $\mu\text{g}$ 以上/g腸内容物となるため, EMのMICが50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の自然耐性のグラム陰性の細菌, 特に大腸菌などではより高度耐性化しないと生き残れなくなる。

このような厳しい生存条件下でどのようにして大腸菌が生き延びようとしてきたのか興味深いものがある。そして, こ

のような細菌の生き残りをかけた進化ともいえるML耐性化はいまやブドウ球菌でもML排出やML不活化を含む多くの遺伝子による多重化耐性機構を武器にして人間界を脅かそうとしている。

現在のML耐性機構は多種類となっているので, 各項目に完全にはわけられることが難しく少々重なって記載せざるをえない。ここでは作用点に関する説明は最小限必要な範囲にとどめ, これまでのML耐性に関する詳細な研究をなるべく広く, かついままでの総説となるべく重ならないようにしたい。また, 特に最近の新しい種々のML耐性や, 詳細にまとめられたことがない, 著者が1988年に発見した新しいMPH(2')や他のML不活化機構についてもまとめてみたい。

### I. マクロライドの作用点<sup>12)</sup>

ML薬は蛋白合成阻害剤としてよく知られている。MLは30Sと50S粒子のサブユニットでダルマ型粒子(沈降係数70S)として構成される細菌のリボソームと, 40Sと60S粒子のサブユニットで80S粒子として構成される真核細胞のリボソームとの違いによって, その結合性が異なっている。この差が細菌に有効で高等動物に作用しにくいというML薬の選択的抗菌特性になっている。

細菌の30Sサブユニットは16SrRNA(約1,540塩基, 分子量60万)と, S蛋白21種(分子量1万~4万)から構築されている。また, 50Sサブユニットは23SrRNA(約3,200塩基, 分子量110万)と, 5SrRNA(約120塩基, 分子量4万)と, L蛋白34種(分子量1万~4万)から構成されている(Fig. 1)。Fig. 1にはリボソームの構成とML耐性に関連した部位を示した。

蛋白合成はこの30Sリボソーム上でmRNAの開始コドン(AUG)にホルミルメチオニル(f-Met)-tRNAが結合して始まる翻訳開始, そしてペプチド転移, リボソーム上でのペプチジルtRNA転位, 終了, 待機の一連の反応で進んでいく。

EMなどのML薬はグラム(+)菌(-)菌ともに, EM1分子が1つの50Sサブユニットに結合すると推定され, 23SrRNAとL16蛋白の構成部分近傍にあるペプチジル部位とアミノアシル部位の間にML薬が結合して障害物となり, ペプチド転移反応が阻害され, 最終的にアミノ酸鎖伸長が阻害される。また, EMの阻害はペプチジル部位依存結合もしくはペプチジルtRNAの解離に影響するともいわれるが, 最近ではML薬の作用機序として(1)蛋白合成のペプチジル転位阻害(EMとケトライドとの作用点の違いも見つかっている)<sup>44,45)</sup>や, (2)50Sサブユニット会合阻害によるmRNA翻訳阻害が報告されている<sup>12)</sup>。

さて, このようなMLの抗菌性に対して, いろいろな臨床分離ML耐性菌はどのように対処して生存しようとしているのであろうか?(Table 1)

## II. ブドウ球菌、連鎖球菌、バチルス属などのグラム (+) 菌の *erm* 遺伝子 (リボソームメチラーゼ) を中心としたマクロライド耐性機構

グラム (+) 臨床細菌における ML 耐性に関しては、ブドウ球菌などにおいて詳細に研究されてきた<sup>3-12)</sup>。これら臨床分離株に関しては、日本では以前にその ML 耐性パターンから、すべての ML に高度耐性を示す構成型の A 群菌, EM, OL で耐性誘導される B 群菌, EM のみで耐性誘導される C 群菌の 3 種の分類がなされていたが、現在ではほとんど用いられていない。

これまでに見いだされたブドウ球菌の主たる ML 耐性機構は薬剤の標的部である 23 S rRNA のアデニン (*E. coli* での番号付けでは 2058 位) の N-ジメチル化による薬剤親和性低下である。その耐性遺伝子としては誘導型の *ermA* (erythromycin-resistance methylase A) および *ermC* 遺伝子, そして構成型の *ermB* 遺伝子などが知られている (Table 2)。これらの遺伝子をもつ株は, ML のみならずリンコサミドやストレプトグラミン B に対しても交差耐性 (MLS 型耐性) を示す。

これまで, MLS<sub>B</sub> 抗生物質に対してもっとも広く見ら

Table 1. The list of macrolide resistance mechanism of clinical isolates

- (1) N-dimethylation of A 2058 in 23 SrRNA in 50 S ribosome
- (2) Base mutations on multiple sites in 23 SrRNA in 50 S ribosome
- (3) Protein mutation of 50 S ribosome subunit
- (4) Macrolide efflux protein
- (5) Permeability change of macrolide
- (6) Erythromycin esterase (hydrolysis of EM ester-ring)
- (7) Macrolide 2'-phosphotransferase  
(macrolide 2'-phosphorylating inactivating enzyme)
- (8) Macrolide 2'-glycosyl inactivating mechanism
- (9) C 6-formyl-reducing mechanism of macrolide
- (10) C 4'-deacylation of macrolide

Table 2. Abbreviation of macrolide resistance gene and protein

<i>Gene</i>	
<i>erm</i>	Erythromycin-resistance methylase
<i>erp</i>	Erythromycin-reduced permeability
<i>ere</i>	Erythromycin esterase
<i>mph</i>	: Macrolide 2'-phosphotransferase
<i>msr</i>	: Macrolide (14- and 15-member ring)-Streptogramin-B-resistant gene (ATP-dependent efflux system)
<i>mre</i>	: Macrolide-resistant efflux
<i>Protein (Enzyme)</i>	
Erm protein	: Ribosome (A 2058)-methylase produced from <i>erm</i> gene
<i>Resistance phenotype</i>	
MLS (MLS <sub>B</sub> )	: Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance
PMS	: Partial macrolide and streptogramin B resistance
MS	: Macrolide-streptogramin B resistance

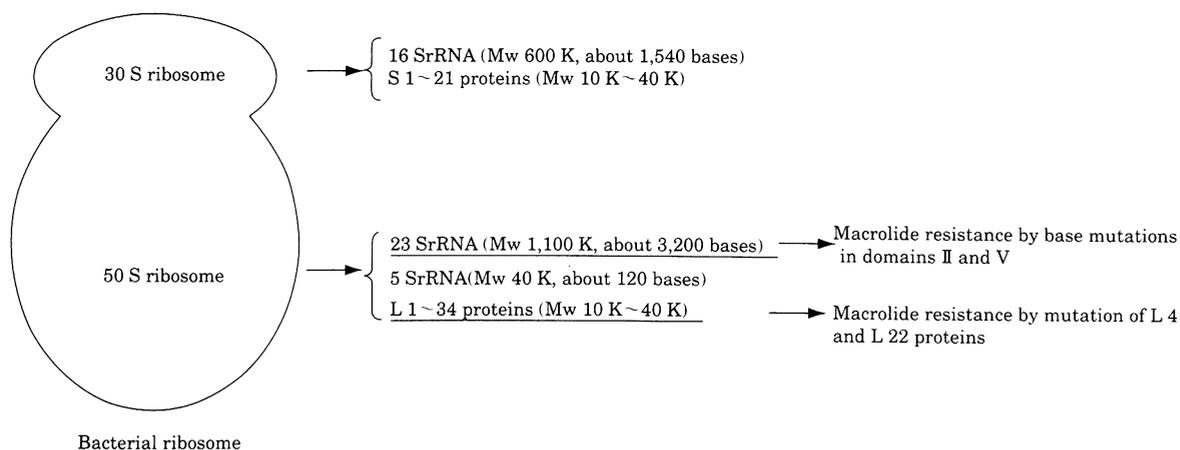


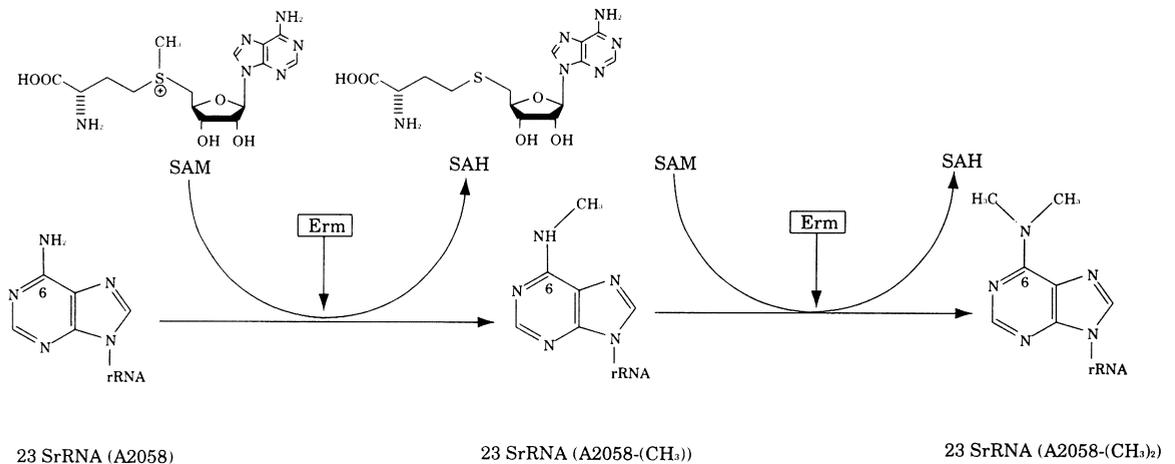
Fig. 1. Structure of ribosome and the mutation point on macrolide clinical isolates.

れる MLS 耐性機構は大腸菌へクローニングされた *erm* 遺伝子や、その発現した Erm 酵素で詳細に解析されている。このリボソームメチル化酵素は互いに関連性の高い蛋白のファミリーを構成しており、メチル供与体として S-アデノシルメチオニンを利用して初期段階の 23 SrRNA における 2058 位アデニン残基 (A 2058) をメチル化修飾する。その詳細な反応機構は、Erm 酵素が 23 SrRNA の A 2058 の C 6 位 NH<sub>2</sub> 基に対して S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) のメチル基を一分子転移させ、S-アデノシル-L-ホモシステイン (SAH) を生じるものである (Fig. 2)。このようにして N<sup>6</sup>-モノメチル化されただけでリボソームは ML 耐性に変化する

る。そして、このメチル化酵素反応が 2 回起こって A 2058 部位-N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-ジメチル化 23 SrRNA ができる (Fig. 2)。このことによって、抗菌作用点が変わり、ML とは結合できなくなって耐性化する (Fig. 3)。

リボソーム修飾による EM 耐性 (*erm* 遺伝子) に関しては、1991 年にハイブリダイゼーション法によって少なくとも 8 クラスにわけられた。また、誘導型 MLS 耐性遺伝子 *ermC* の mRNA コンフォメーション変化が証明されている<sup>3)</sup>。

そして、1995 年までには、多くの *erm* 遺伝子ファミリーや ML 耐性遺伝子が知られており<sup>3,6,10)</sup>、これらを次にまとめた。*ermA* (*S. aureus* Tn 554, Coagulase-nega-



SAM : S-adenosyl-L-methionine

SAH : S-adenosyl-L-homocysteine

Erm : Erythromycin-resistance methylase

Fig. 2. Methylation mechanism by S-adenosyl-dependent Erm protein to A 2058 site in 23 SrRNA.

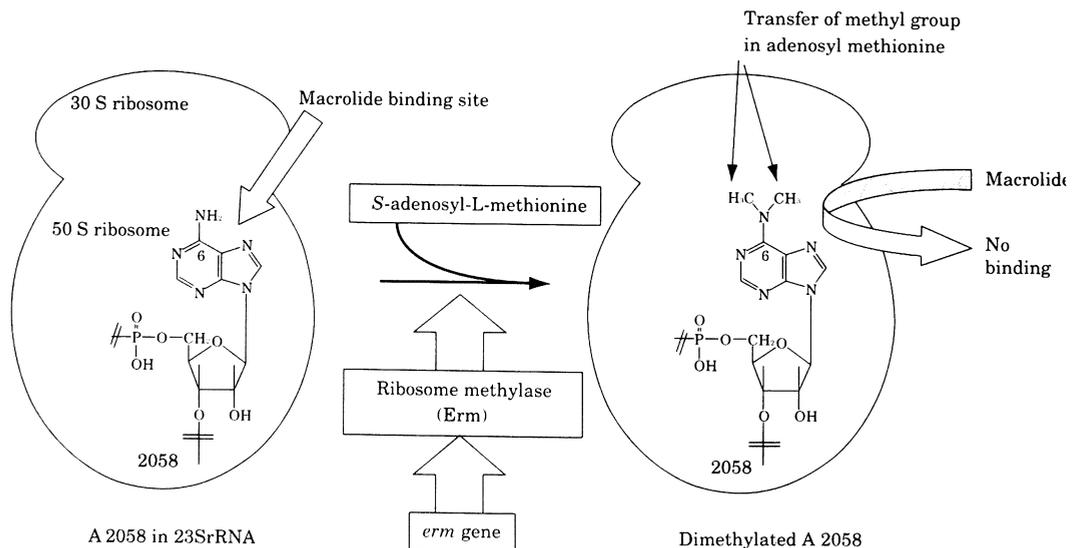


Fig. 3. Ability of macrolide to bind to 23 SrRNA and methylated 23 SrRNA in 50 S ribosomal subunit.





素をコードする不明の *erm* 遺伝子を持っている。さらに、*mph* 様遺伝子 (*mphBM*: 299 アミノ酸) が 5'-*msrSA*'-*mphBM*-3' の順で存在し、それは大腸菌由来の *mphB* (後述) と比べて 67% のアミノ酸類似性を持っていた<sup>63,64)</sup>。

以上、臨床分離ブドウ球菌などのグラム (+) 菌での ML 耐性化機構をまとめると、(1) 23 SrRNA 変化、(2) ML 透過性の低下が知られている。最近になって、(3) 能動的 ML 排出ポンプ系と、(4) ラクトン環加水分解酵素 (EM エステラーゼ; *ere* 遺伝子、後述; ただし、15 員環 ML の AZM は非分解) による両耐性機構を併せ持つ株や、マクロライド 2'-リン酸化酵素 II 型遺伝子 (*mphB*、後述) 保有推定株が報告されている (Fig. 5)<sup>61,62)</sup>。

最近ではさきに示したようにブドウ球菌で *erm* 遺伝子、*msr* 遺伝子、*ere* 遺伝子や、*mphB* 様遺伝子 (不活性化物は未同定) が同じ株に複数耐性遺伝子群として存在することが知られている。

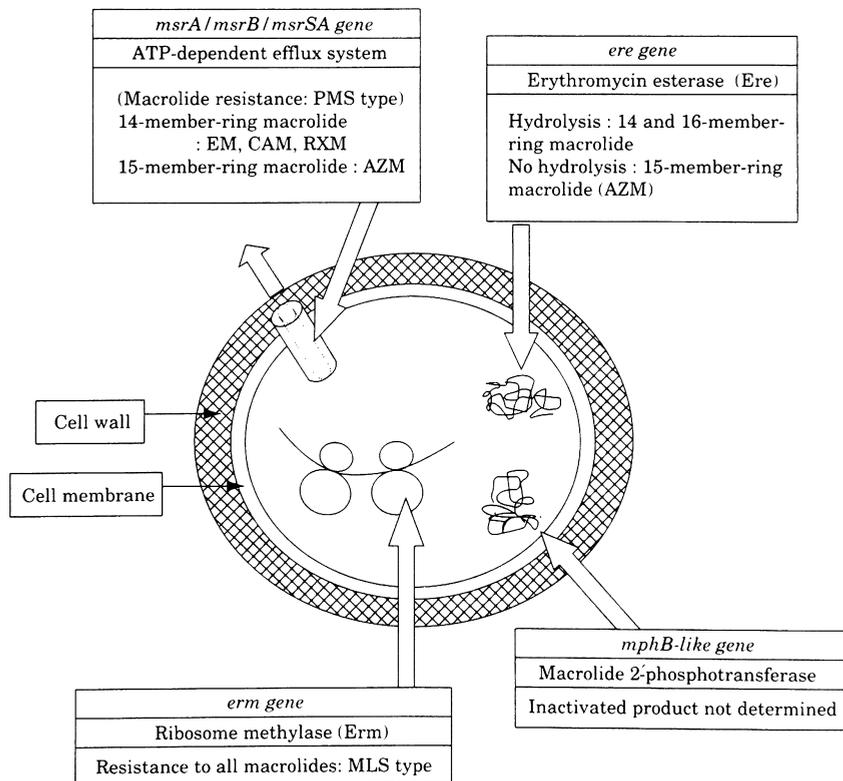
このように、ML 耐性菌は ML 耐性遺伝子を多重化していくという生存方法により、さらに効率よく生き残っていくと考えられる。

### III. *Streptococcus pneumoniae* や Group A *Streptococci* のマクロライド耐性機構—薬剤排出系 (*mef*) 遺伝子を中心として—

*Streptococcus pneumoniae* による中耳炎や鼻腔炎では EM の組織内濃度がせいぜい 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ほどにしかならないが、最近では EM 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の *S. pneumoniae* の ML 耐性菌が出現してきて、注目を浴びている。

1996 年には LCM 感受性で高度 ML 耐性 (*ermAM*) と低度 ML 耐性の *S. pneumoniae* が見い出された<sup>65)</sup>。この 41% におよぶ低度 ML 耐性株のリボソームは感受性菌のリボソームと同じ<sup>14</sup>C-EM 結合性を示し、*ermA*, *ermC*, *ermAM*, *ereA*, *ereB*, *msrA* 遺伝子をもたず、不活化もなかった。

*Streptococci* に関しては (1) *ermAM* 遺伝子支配の耐性タイプがある。また、ブドウ球菌や緑膿菌などで近年よく取り上げられている薬剤排出 (efflux) 系が最近では *Streptococcus pyogenes* (*mefA* 遺伝子)<sup>66)</sup> や *Streptococcus pneumoniae*<sup>67,68)</sup> にも見い出されており、(2) それらと似た排出系の *mefE* 遺伝子 (テトラサイクリン排出蛋白 TetB 類似の 12 回膜貫通疎水性蛋白、406 アミノ酸、分子量: 439,000、能動輸送システム MefA 蛋白と 94% アミノ酸相同性) 支配の 14 員環 ML 排出を行う MefE 蛋白によるタイプが知られている。これら臨床分離株の *S. pneumoniae* と *Streptococcus pyogenes*



EM: erythromycin, CAM: clarithromycin, RXM: roxithromycin, AZM: azithromycin

Fig. 5. Macrolide resistance mechanism on *Staphylococci* clinical isolates.

においては、排出ポンプと *mef* が最近同定され、すぐれた総説がある<sup>69)</sup>。

1997年の *S. pneumoniae* や Group A Streptococci 由来の *mefE*, *mefA* 遺伝子の配列の報告では、それらは88%の相同性を持っている。MefE 蛋白は EM, RXM, CAM, AZM などの14, 15員環 MLのみを排出することが示され、16員環 ML に対する耐性は見られていない。*mefE* 遺伝子は M 表現型 (ML 耐性だがクリンダマイシンやストレプトグラミン B 感受性) を示す<sup>68)</sup>。*mef* 遺伝子は *Streptococcus agalactiae*, グループ C やグループ G の連鎖球菌においてよく見出されており、EM 中程度耐性株の *E. faecium* においても報告されている。

ブドウ球菌において、この *mef* 遺伝子による ML 耐性が EM で誘導される<sup>70)</sup>。この *mef* の内部にあるプローブを用いたハイブリダイゼーションでは2つのバンドが現れ、1つは1,100 bp であり、もう1つは2,300 bp であった。小さいバンドは Mef 蛋白をコードする配列に対応しており、大きなバンドはおそらく *mef* 遺伝子がコードされている位置より下流にある第2遺伝子を含んでいると思われる。

最近、臨床分離 *S. pneumoniae* 由来の ErmB 蛋白の溶液中の構造が発表された。それによると、ErmB の主要な触媒ドメインは Erm 以外のメチルトランスフェラーゼと比較したときに保存されているが、その基質の結合ドメインは ErmB 固有のものであった (後述: 項目 XIII)。

臨床分離 A 群 Streptococci 3205 株がカナダ・オンタリオ州で1997年に収集されその ML 耐性の伝播や耐性機構が調べられた<sup>71)</sup>。EM 非感受性は2.1%で、このうちの70%はクリンダマイシン感受性であり、PCR 法で *mef* 遺伝子が見い出された。残り20株のうちの18株と2株はクリンダマイシンに対してそれぞれ誘導型耐性と構成型耐性だった。これらのうちの19株は PCR 法で *ermTR* 遺伝子を持っていたし、1株が *ermB* 遺伝子をもっていた。EM 耐性1株もまたテトラサイクリン耐性であったが、すべてがペニシリンとクロラムフェニコール感受性であった。

*Streptococcus agalactiae* の ML 排出遺伝子が 大腸菌にクローニングされ AZM, EM, SPM に対して耐性を示した。その部分欠失株は14と15員環に対して耐性であるが、16員環に対しては耐性ではなかった。放射ラベル EM の大腸菌への取り込み実験で排出系への関与が明らかとなった。この推定排出因子は *Streptococcus pyogenes* や *Streptococcus pneumoniae* の Mef ポンプとも、*Staphylococcus aureus* とコアグララーゼ (-) staphylococci の MsrA ポンプとも異なっていた。そこで、これは *mreA* 遺伝子と決められた<sup>72)</sup>。この MreA 蛋白はフラボキナーゼ活性を持っていることが報告されている<sup>73)</sup>。

#### IV. 自然突然変異の大腸菌と *Streptococcus pneumoniae*, および臨床分離 *S. pneumoniae* でのリボソーム蛋白変異によるマクロライド耐性

最近、リボソーム蛋白 L 22 と L 4 での EM 耐性変異が *E. coli* リボソームの 23 SrRNA のコンフォメーションに与える影響について研究された<sup>74)</sup>。化学プローブに対する反応性の変化が 23 SrRNA の多くの塩基部位でみられた (Fig. 1)。大腸菌の L 4 変異株はドメイン II の G 799 位と U 1255 位の反応性に、またドメイン V の A 2572 位の反応性に影響する。L 22 変異株はドメイン III の A 1614 位やドメイン V の G 2351 位におけると同じく、m<sup>5</sup> (5 位がメチル化された) U 747 位、G 748 位と A 1268 位などのドメイン II の修飾に影響する。A 789 位の反応性は L 22 と L 4 変異株で若干高められている。いままではこれらの塩基変異は ML 耐性と関連していなかった。興味あることには、リボソーム耐性変異による影響はドメイン V のメチレーション部位、または変異によって変化する ML 耐性を反映する高頻度部位である A 2058 位近隣の範囲にはない。したがって、これらのリボソーム変異が rRNA 3 次元構造を乱す作用をして抗生物質耐性になることが示唆されている。

一方、AZM を選択薬剤として得られた *Streptococcus pneumoniae* 自然突然変異株の ML 耐性についても研究が行われている<sup>70)</sup>。これらの変異株は14, 15員環 ML に対して耐性を持つが、既知の ML 耐性遺伝子は存在しておらず、その 23 SrRNA の配列を調べると、ドメイン V の C 2611 A, C 2611 G, A 2058 G, A 2059 G (*E. coli* での番号付け) の変異が明らかとなった。4つの変異のうち3つはヘテロ性、つまり、すべての 23 SrRNA が変異を含んでいるわけではないことが示された。一方、4つめの変異 (C 2611 G) はホモ性、すなわち、すべての 23 SrRNA が C 2611 G の変異を持っていた。ストレプトグラミン B に対しては、C 2611 A, C 2611 G, A 2058 G が、そして16員環 ML に対してはすべての変異が、またクリンダマイシンに対しては A 2058 G の変異がそれぞれの耐性を持つ際に協力して働く。興味深いことに、これらの変異のどれもケトライド (テリスロマイシン: HMR 3647), EM に対して高度耐性を示さない。さらに、変異株の2つはリボソーム蛋白 L 4 におけるよく保存されたアミノ酸配列 (63 KPWRQKGTGR-AR 74) に変化を持っている。1つの変異株では、単独のアミノ酸変異 (G 69 C) を含んでいる。また一方では、R 66 と Q 67 のアミノ酸の間に2つのアミノ酸 (QS) が挿入されている。知る限りでは、これは ML 耐性 *S. pneumoniae* 株のリボソーム蛋白または 23 SrRNA 遺伝子における変異に関して初の報告である。

Sutcliffe J ら<sup>70)</sup>は 23 SrRNA に変異を持つ臨床分離肺炎球菌株を見つけていない。しかしながら、ヨーロッパ (ブルガリア, スロバキア, ポーランド) において、L 4

蛋白に変異を持ついくつかの臨床分離株を見つけている。これらの株は既知の耐性因子をまったくもっておらず、23 SrRNA における変異もなかった。これらの株は MS 表現型 (EM とストレプトグラミン B には耐性であるが、クリンダマイシンには感受性) を持っている。そのうち、R 6 株において 69 位から 71 位までのアミノ酸が GTG であったが形質転換後では TPS に変化していた。肺炎球菌 L 4 変異株は、*E. coli* において述べられた L 4 変異株<sup>75)</sup>とは異なっており、温度感受性の生育を示さない。

#### V. *Campylobacter* のマクロライド耐性

カンピロバクター胃腸炎の治療に際しては選択薬剤である EM が用いられており、その耐性機構が 1991 年に調べられている。*Campylobacter jejuni* と *C. coli* の 3 臨床分離株での MIC が 1,024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の EM 耐性機構は構成型で染色体性であった。EM 感受性の *C. jejuni* と *C. coli* の生体内蛋白合成は EM 低濃度 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で完全に阻害されたが、EM 耐性菌においては高濃度 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) でもなにも影響はなかった。これらは菌体外での不活化は見られず、<sup>14</sup>C-EM の取り込みの比率と量は耐性と感受性でほぼ同じであった。50 S リボソームと同じく精製したカンピロバクター 70 S リボソームとの <sup>14</sup>C-EM 結合性は耐性のほうが非常に低かった。RNA メチラーゼの産生もなかった。したがって、リボソーム蛋白遺伝子の変化による耐性の変異機構とされた<sup>76)</sup>。

1994 年にはタイ駐留アメリカ軍の中で、旅行者下痢症を起こした時に、シプロフロキサシンと AZM 耐性の *Campylobacter* が見つかった<sup>77)</sup>。

1996 年には HIV 感染患者の *C. jejuni* 胃腸炎に対してシプロフロキサシンで、さらに引き続いて RXM で治療されている。治療後に再度分離した *C. jejuni* は両薬剤に耐性化していた<sup>78)</sup>。これは治療中に耐性化するという初めての証拠の報告となった。

デンマークで人または食用動物から分離された *Campylobacter jejuni* 202 株、*C. coli* 123 株、*C. lari* 6 株の 16 抗生物質に対する MIC が 1997 年に報告された<sup>79)</sup>。このうち、大部分の場合は TYL, SPM, EM に一緒に耐性化しているかこれら 3 剤に感受性であるかのいずれかであった。特に、豚由来の *C. coli* では ML とストレプトマイシンに高度耐性であった。これら *Campylobacter* は分離源によって抗生物質耐性は異なっていた。

#### VI. 非定型抗酸菌 *Atypical Mycobacteria* や *Helicobacter pylori* でのマクロライド耐性化機構

最近、病原菌株の 23 SrRNA における重要な点変異について報告されてきている。*Mycobacterium intracellulare* や *Helicobacter pylori* のような非典型的な病原菌に対して第 2 世代 ML を用いた治療を行った場合、23

SrRNA のドメイン V における変異が MLS 抗生物質耐性を与えることが報告されている。また、同じくドメイン V に存在する A 2058 G/C/U と A 2059 G のようなヌクレオチド変異がそれぞれ、*M. intracellulare*<sup>80)</sup> や *M. avium*<sup>81)</sup> と *H. pylori*<sup>82,83)</sup> において見いだされている (Fig. 4)。

Fig. 4 の基本塩基は *M. avium* の 23 SrRNA で示してあるが、塩基配列は種によって少し異なる。23 SrRNA はドメイン I~VI からなるが、ML 耐性のリボソーム変異点はドメイン V の 2058 位近傍で見られる。このドメイン V のループは蛋白合成のときのペプチジル転移酵素活性を持つため、このループは RNA が酵素活性をもつ、いわゆるリボザイムの活性部位になっている。この部位に ML が吸着するとペプチジル化ができなくなって、抗菌力が発揮される。したがって、この部位が変化すると ML が吸着できなくなり ML に耐性化する。

非定型抗酸菌 *Atypical Mycobacteria* は結核菌以外の *Mycobacterium* 属 (グラム (+), 好気性桿菌) の総称で、非定型抗酸菌は感染により結核と同様の病態を呈するが、いわゆる日和見感染菌で、一般に毒力が弱く、その臨床症状は宿主の抵抗性に左右される。この非定型抗酸菌症では *M. avium* complex (MAC) が 70% と最多であり、次に *M. kansasii* 20%、その他 *M. fortuitum*, *M. chelonae* などがある。これらは *M. kansasii* など一部を除き、リファンピシン、ストレプトマイシン、イソニアジドなどの抗結核剤に対して耐性である。

人から人への伝播がきわめてまれであることから、結核に比べて重要視されてこなかったが、近年エイズ患者における播種性 MAC 疾患が重大性をおびて現われつつあり、有効な薬剤が望まれていた。

この状況下で、多くの抗生物質に自然耐性を示す難治性非定型抗酸菌症の特効薬として半合成 ML の CAM が 10 年にわたって注目されてきた。CAM は予後の悪いエイズ患者のうち、伝播された MAC 患者に劇的な効果を示し、また、経口投与が有効であること、副作用の少ないことから優れた抗菌剤として推奨され、現在おいに使われている<sup>84)</sup>。

しかし、近年使用量の増加にともなってさまざまな非定型抗酸菌において耐性菌の出現が報告され、CAM 耐性の *M. chelonae* 群 (*M. chelonae* と *M. abscessus*) は 1990 年分離 65 株、1991 年分離 174 株では 0% であったが、1992 年分離 181 株、1993 年分離 123 株、1994 年分離 163 株、1995 年分離 194 株では、おのおの 2.2, 2.4, 1.2, 4.6% の耐性菌が見い出されている。さらにその獲得耐性の機構が 23 SrRNA の塩基変異によることが報告されている<sup>80,81,85-88)</sup>。

*Myobacterium intracellulare* に関して、異常な慢性肺病レントゲン映像を示し痰の多い患者に対する CAM 250~1,000 mg/1 日経口 2 回投与 4 か月間の臨床治療

試験が行われた<sup>90</sup>。一方で、その単独投与は他の抗菌薬と比較して容易に耐性化を導くという臨床報告もなされた。CAM 耐性の *Mycobacteria* が年を重ねるにつれ、増加している。現在のところ、耐性機構としては ML 作用点である 23 SrRNA のペプチジルトランスフェラーゼ部位の点変異 (*E. coli* の A 2058 位, A 2059 位に相当) が複数報告され、CAM 耐性を与えていることがわかっている (Fig. 4)<sup>89</sup>。

一方で G 2057 における置換が *Propionibacteria* に ML に対して低レベル耐性を与えることが発見された<sup>70</sup>。この G 2057 の変異は通常、14 または 15 員環 ML に耐性を与えるが、16 員環 ML やリンコサミドには耐性を与えない。

この数年来、アメリカでは ML は種々の呼吸器感染症などに汎用され、なかでも CAM や AZM などのニュー ML が EM 低感受性、あるいは詳細不明な EM 耐性細菌を持つ小児科患者に対して用いられ、さらに *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, MAC などの高頻度に出現してくる EM 耐性細菌に有効に使われている<sup>90</sup>。

#### VII. 腸内細菌のエリスロマイシンエステラーゼ遺伝子 (*ereA*, *ereB*), エリスロマイシンリボソームメチラーゼ遺伝子 (EM 耐性メチラーゼ遺伝子: *erm*) による高度エリスロマイシン耐性

通常の大腸菌では EM の MIC が 50~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の低度自然耐性を示すが、1984 年に EM 2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の MIC を示す大腸菌高度 ML 耐性株がフランスの患者から見いだされた<sup>91-93</sup>。その ML 高度耐性遺伝子クローニング株 BM 694/pAT 63 で EM エステル環加水分解不活化物の構造が決定された<sup>94</sup>。このときに対照として、EM 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の高度耐性非不活化株 BM 2506 (後述) が用いられた。

この *ereA* 遺伝子の塩基配列 1,032 bp (EreA 蛋白の推定 Mw 37,756, SDS-PAGE では 43,000) が決められ、その GC 含有は 50.5% で *E. coli* の GC 含有率 (50%) に近かった<sup>95</sup>。

その後、経口投与患者の糞便中の EM 濃度が 500~6,000  $\mu\text{g}/\text{g}$  となっていることがわかり、患者分離高度耐性腸内細菌が *ereA* プローブを使ったコロニーハイブリダイゼーションで調査された。*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Coliform*, *Enterobacter agglomerans* など EM 不活化が見いだされたが、*ereA* を含めて少なくとも 2 種の *ere* 遺伝子があった<sup>96</sup>。

そこで、もう 1 つが解析され、EM エステラーゼ II 型をコードする *ereB* 遺伝子の塩基配列 (1257-bp, Mw 48,118) が、また、SDS-PAGE で Mw 51,000 蛋白の存在が明らかにされた<sup>97</sup>。すなわち、プラスミド由来の *ereA* と *ereB* 遺伝子は EM エステラーゼをコードしており、この酵素は 14, 15 員環 ML のラクトン環を特異

的に切断する。この *E. coli* BM 2195 は高度耐性で構成型 EM エステラーゼを産生し、この EM 耐性遺伝子は非相補性 X 群に属する 61-kbase 自己伝達性プラスミド pIP 1100 上に存在していた<sup>98</sup>。一方、EM 高度耐性 *E. coli* BM 2570 は 2 つの異なった機構をもち、それらの遺伝子は 150-kbase 自己伝達性 pIP 1527 にあり、別々にわけてクローン化された。単一蛋白 Mw 27,000 は *erxA* (後述: 現在では *ermBC*) 遺伝子にコードされ、不活化とは別の高度耐性 MLS<sub>B</sub> 型を示していた。腸内細菌臨床分離株では以前に報告されたことのないこの耐性表現型はリボソーム修飾によっていると示唆された。*ereB* 遺伝子は EM と OL を不活化する酵素をコードしているが、*erxA* と *ereB* 特異的な 2 つの異なった機構は EM 高度耐性を示し多くの付加的機能をおよぼしている<sup>99</sup>。

腸内細菌属での EM 高度耐性の腸管内常在性がフランスの血液学・腫瘍学病棟で 4 年間探索された結果、555 患者から 54 株 (9.7%) が見いだされた。これは病院全体の EM 消費量とは関連なかったが、個々の患者の EM 投与量と強く関連していた<sup>100</sup>。EM 高度耐性腸内細菌科の 112 株で *ereA*, *ereB*, *ermAM* に関連した塩基配列の分布がコロニーハイブリダイゼーションで調べられた。EM エステラーゼ I 型と II 型をコードしている *ereA* や *ereB* が 14 員環 ML (EM と OL) 不活化株で検出された。不活化によって耐性になる 52 株すべてから *ereA* (23 株), *ereB* (23 株) もしくは両方 (6 株) の遺伝子が検出されたことから、2 つの遺伝子型が耐性表現型で説明できた。MLS<sub>B</sub> 抗生物質の MIC 測定値から、*ermAM* のハイブリダイゼーションと MLS<sub>B</sub> 耐性表現型との関係がわかった。*ermAM* とハイブリダイズしないで MLS 抗生物質耐性をともなっていた 11 株の存在から、グラム (+) 菌にあるように腸内細菌科の MLS 耐性には rRNA メチラーゼの別の種類が含まれていることを示唆していた。このことは *ereB* と *ermAM* 遺伝子がリンクしているのかもしれない。それらは外来性であるけれども、すでに *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. などの腸内細菌の中にまき散らされており<sup>101</sup>, *ereA* (20%), *ereB* (7%), *ermAM* (5%), *ereA/ereB* (3%), *ereB/ermAM* (13%), *ereA/ereB/ermAM* (4%), 3 遺伝子 (-) 型 50% であった。後になって、この 50% のうちの 1 株 BM 2506 (前述) で筆者が新たな耐性化機構を見出すことになる。

#### VIII. 大腸菌でのマクロライド 2'-リン酸化不活化酵素遺伝子 (*mph*) による高度耐性化

著者は日本での臨床分離大腸菌 197 株から 1 株, *Klebsiella pneumoniae* 77 株から 3 株, *P. aeruginosa* 300 株から 9 株を EM 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  平板上で選択した。その 13 株のうち、14 員環 ML にのみに高度耐性を示

す大腸菌 Tf481 A 株 (MIC: 1,600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上) のみがアデノシン 5'-リン酸 (ATP) 依存性の不活化を示した。この OL 不活化物は核磁気共鳴スペクトル (NMR) 法と質量分析法による構造解析によって、2'-リン酸化 OL と決定された (Fig. 1)<sup>102)</sup>。

この株のマクロライド 2'-リン酸化酵素 (MPH (2')) は誘導型であり、これを精製して 14 員環 ML をよく不活化するタイプであることや至適 pH 8.2, 至適反応温度 40°C で、50°C 1 分で失活すること、等電点は 5.3, Mw は 34,000 であることを初めて明らかにした。補酵素の反応性はプリン塩基の方がピリミジン塩基よりもはるかに高かった<sup>103)</sup>。また、この MPH (2') I 遺伝子 (*mph*) は非伝達性だったが、伝達性プラスミドと共に可動化する遺伝子であった<sup>104)</sup>。

また、前述のようにパスツール研究所分与の EM 高度耐性大腸菌 BM 2506 株は以前に不活化がないコントロール株として報告されていた<sup>94)</sup>。しかし、筆者に分与されたために新型 ML 不活化酵素が初めて発見されることになった。この株は 16 員環 ML にも高度耐性であり、16 員環 ML もよく不活化する II 型 MPH (2') をもっており、その至適反応 pH, 温度、等電点、分子量はそれぞれ、8.2, 40°C, 5.3, 48,000 であった<sup>105)</sup>。また、日本分離 EM 耐性大腸菌株 L 441 D を新たに発見し、その酵素液は Tf481 A 株と同じ基質特異性を示した<sup>106)</sup>。そして、後にこの菌 L 441 D 株での *mphA* 遺伝子の存在が PCR 法で明かとなった<sup>61)</sup>。

また、この際にエレクトロ・スプレイ質量分析法、キャピラリー Mass/Mass 法<sup>107-109)</sup> および GTP を補酵素とした MPH (2') 酵素反応解析 NMR 法を新たに確立した<sup>106)</sup>。この解析から 2'-OH がアセチル化されていて酵素が反応できないと考えられているトリアセチル OL での ML リン酸化反応の詳細が明らかとなった。この反応はまず、2'-アセチル基がリン酸緩衝液中で自然解離し、次に ATP の  $\gamma$ -リン酸が MPH (2') 酵素によって 2'-OH 位に転移するという機構であった。

一方、EM エステラーゼ解析用の NMR 法を確立し、その後のエステラーゼ検出法としてたいへん手軽に使用できるようになった<sup>110)</sup>。また、マクロライド 2'-リン酸化物とエステル分解物の 2D-NMR による <sup>1</sup>H または <sup>13</sup>C ケミカルシフトが詳細に解析された<sup>111)</sup>。

最近では 14 員環ニュー ML として、CAM や RXM がよく用いられている。これらに対して、ML 不活化酵素の反応性を調べた。MPH (2') I 産生菌では EM 前処理で耐性誘導すると EM と CAM の MIC は上昇したが、RXM の MIC は変化はなかった。非誘導型 ML 耐性の MPH (2') II 産生菌では CAM の方がより感受性だった。一方、非誘導型 EM エステラーゼ産生菌では EM より RXM に対してより感受性であった。RXM と CAM は MPH (2') I と II とエステラーゼの 3 種類の

不活化酵素によって EM よりも不活化されなかった。これは将来の ML 開発に有用なデータとなるであろう<sup>112)</sup>。

一方、Tf481 A 株由来の ML 耐性遺伝子部分 3.3 kb をクローニングし、塩基配列を決定したところ、MPH (2') I 型産生遺伝子 *mphA* および高度耐性に関連する未知遺伝子 *emrX* が存在していた。

これら MPH (2') I と MPH (2') II の各産生株からおのおの、*mphA* 遺伝子<sup>113)</sup> と *mphB* 遺伝子<sup>114)</sup> をクローニングし塩基配列を解析した。その相同性は推定アミノ酸レベルで 37.4% であり、各遺伝子の由来が異なっていることが明らかとなった。また、韓国で分離された *mphK* 支配の ML 耐性菌ではその塩基配列が少しだけ異なり、5 アミノ酸長い類似 MPH (2') I 型をもっていると報告されている<sup>115)</sup>。

*mphB* 遺伝子は 2 種の非伝達性プラスミドにのっていたが、プラスミド RP 1 を伝達すると一緒に伝達した<sup>116)</sup>。

最近の日本では ML の使用量が増大している。この状態下で多くの臨床分離 ML 耐性菌株から ML 不活化株を簡便迅速に見い出す必要性が生じてきた。そこで ML 不活化簡便法として、リゾチーム、DNase, RNase (LDR) 法を考案し、1997 年の分離大腸菌から新たに 3 株の MPH (2') 産生菌を見出した<sup>117)</sup>。このなかの CU 1 株はいままでの ML 高度耐性菌とは異なった EM, ABPC, SM, TC 耐性をもち、非伝達性 57 Mdal プラスミドに ML 耐性遺伝子をもっていた。基質特異性でこの MPH (2') II の性状は以前のものとは少し変わっていたが塩基配列が一致したことから、1984 年フランス分離株 BM 2506 由来の遺伝子 *mphB* が日本にも出現したことが明らかになった<sup>118)</sup>。この遺伝子を用いて MPH (2') II の ATP 結合部位であるモチーフ 1 と 2 の近辺を中心にそのアスパラギン酸 (Asp) をアラニンに変えて機能性アミノ酸残基を調べた。部位特異的変異導入法によって作った変異酵素 D 200 A, D 209 A, D 219 A, D 231 A では MPH (2') II 活性が失活し、これらが活性中心構造部分であることを証明した。一方、D 227 A 酵素は元株酵素と比べ 7% の活性を残し、さらに基質特異性が変化したことから考察して、D 227 位が糖鎖認識に強く関係している可能性を示唆した<sup>119)</sup>。

#### IX. ブドウ球菌でのマクロライド不活化

はじめに臨床から見い出されたグラム (-) 腸内細菌の高度 EM 耐性の要因はラクトン環を加水分解するエステラーゼや MPH (2') の産生によるものであったが、いまは臨床分離ブドウ球菌の ML 耐性機構としてこれら 2 つの不活化も知られている。

1971 年分離ブドウ球菌 MS 8968<sup>63)</sup> はプラスミド pMS 97 上に *erm* 遺伝子と *msrSA'* 遺伝子をあわせもっていたが、最近、第 3 の遺伝子としてブドウ球菌ではじ

めて大腸菌由来 *mphB* 塩基と 49% 相似な *mph* 遺伝子 (*mphBM*) が見つかった<sup>64</sup>。

また、米国分離 *S. aureus* 01 A 1032 では *msrA* 遺伝子、すなわち ABC 型トランスポーター (ATP 結合カセット) による 14, 15 員環 ML に対するエネルギー依存的な排出システムを持っており<sup>70</sup>、加えてこの株は Ere 酵素による不活化物と同じものを作っていた。ブドウ球菌 01 A 1032 株で初めて見つかったこのエステラーゼは 14 と 16 員環 ML を共に加水分解したが、15 員環 ML の AZM は分解しなかった<sup>62</sup>。さらに探索してみると、大きなプラスミド pSR 1 (28 kb~) が 01 A 1032 株から分離された。EM 感受性の *S. aureus* 株 RN 4220 にこのプラスミドを形質転換したところ、MS 型 01 A 1032 株と同じ表現型をもつ形質転換株が得られた。しかしながら、RN 4220/pSR 1 は 16 員環 ML を不活化しなかった。この原因はまだ不明である。

まだ、はっきりと示されていないものの、このブドウ球菌 01 A 1032 株のプラスミド上には *msrA* と共にオペロンの第二遺伝子としてマクロライド 2'-リン酸化酵素と推定されている *mphC* (*mphBM'*: *mphBM* とは数塩基異なる) が存在しているといわれる。この *mph* 遺伝子由来の MPH (2') III 蛋白は 14, 15, 16 員環 ML を不活化するようである<sup>70</sup>。RN 4220/pSR 1 株では 14 員環の EM を不活化しているが、*mphC* 遺伝子のみを RN 4220 株にクローニングした場合、*mphC* がリン酸化酵素活性を持つことはまだ示されていない。

以上のようなグラム (+) 病原菌における *ere* や *mph*

による ML の不活化はいままでのところブドウ球菌にとどまっている (Figs. 5, 6)。

**X. 臨床分離 *Nocardia* spp. によるマクロライド 2'-グリコシル化による不活化機構、マクロライドホルミル基 (CHO) 還元化機構、マクロライドの脱アシル化耐性化機構**

日和見感染患者からの臨床分離病原性 *Nocardia* spp. 5 種 (*N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaiviarum*, *N. nova*) の EM, ロキタマイシン, ミデカマイシンに対する MIC が調べられ、それぞれ異なった感受性を示した。このうち、前 4 種に関して、大部分の耐性はマクロライド 2'-リン酸化、グリコシル化、ホルミル基 (CHO) 還元、脱アシル化、もしくはおのおのの組み合わせによる不活化が見いだされている<sup>120</sup> (Figs. 7, 8)。

**XI. 放線菌のマクロライドに対する自己耐性化機構 (Figs. 7, 8)**

一方、土壌由来の放線菌 *Streptomyces coelicolor* からのアンハイドロ EM-2'-リン酸化体と、OL, SPM-I, ロイコマイシン-As, TYL のおのおの 2'-リン酸化体が見いだされた。この MPH (2') は大腸菌のものとは比べて、その酵素化学的性状が大きく異なっている。また、放線菌由来の ML 不活化遺伝子はクローニングされておらずいまだ臨床分離株の MPH (2') との関係は明らかではない<sup>121</sup>。

一方、*Streptomyces coelicolor* UC 5240 のセルフリ-抽出液では EM-A, OL, TYL, SPM-I~III, ロイコ

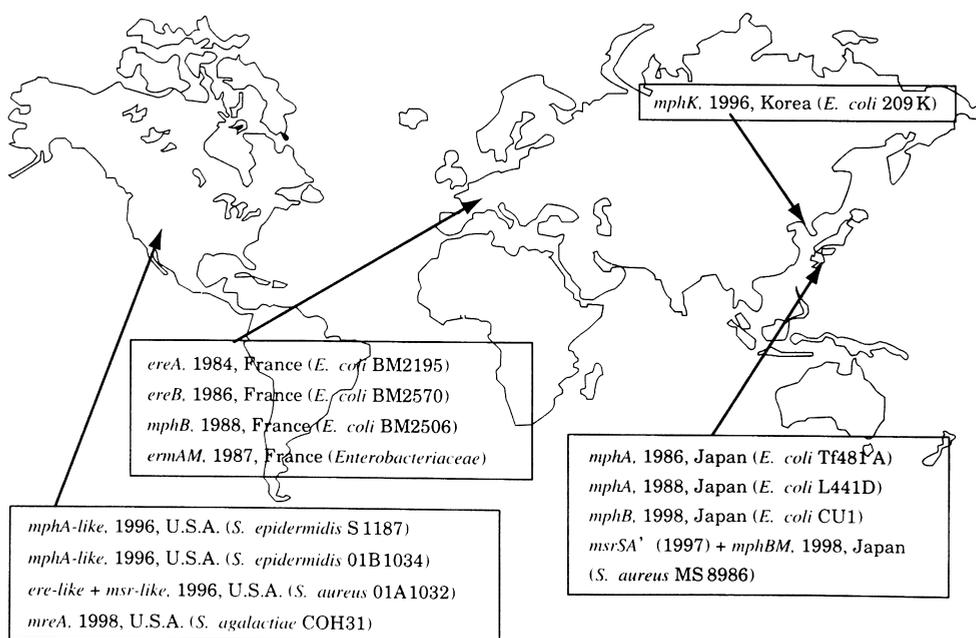


Fig. 6. Resistance genes such as macrolide-inactivating enzymes in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* clinical isolates around the world.

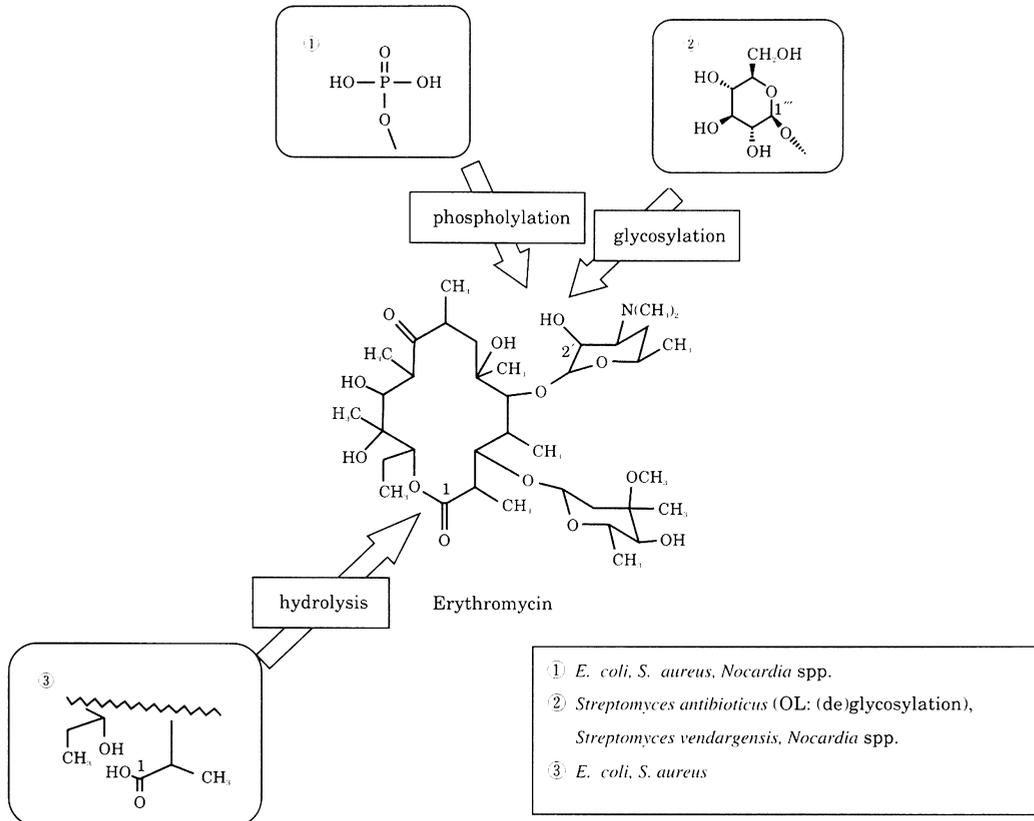


Fig. 7. 14-Member-ring macrolide-inactivating mechanism and strains.

hydrolysis (Erythromycin esterase)    phospholylation (Macrolide 2'-phosphotransferase)  
 glycosylation (Macrolide 2'-glycosylation (Enzyme is unknown))

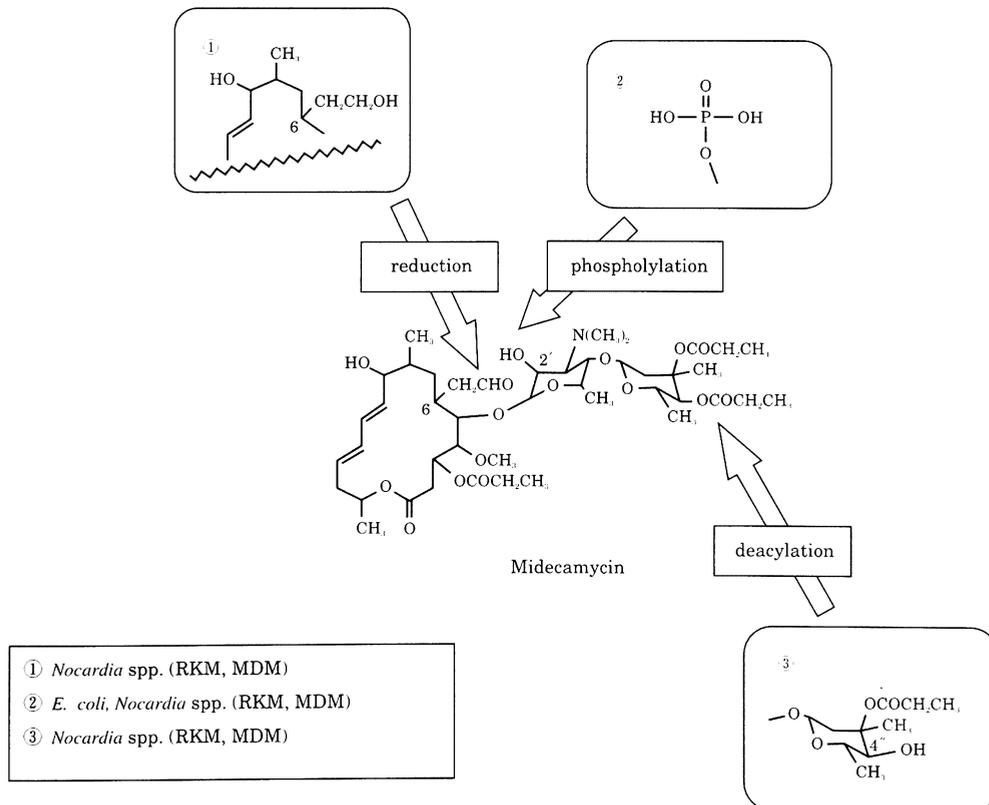


Fig. 8. 16-Member-ring macrolide-inactivating mechanism and strains.

reduction: Reduction of C 6-CH<sub>2</sub>CHO to C<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH

phospholylation: Phospholylation of C 2'-OH by macrolide 2'-phosphotransferase

deacylation: Deacylation of C 4''-OCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> to C 4''-OH

マイシン-A3 に対して酵素的リン酸化がおこり<sup>122)</sup>, その構造は 2'-リン酸化であった<sup>123)</sup>。

EM-A は *Streptomyces vendargensis* ATCC 25507 の培養液中で, グリコシル化不活化体の 2'-(O-β-D-glucopyranosyl) EMA に変化する<sup>124)</sup>。

また, OL 生産放線菌 *Streptomyces antibioticus* では OL がそのリボソームに作用することから, 膜透過性低下が自己耐性に関係しているとされている<sup>125)</sup>。この株の細胞抽出液は UDP-グルコースの存在下で OL を不活化できる。その不活化は生物活性の消失, もしくはクロマトグラフィーでの移動度変化で検定されている。この酵素活性はラクトン環にリンクした単糖中のフリーの 2'-OH を含む他 ML (ロザラミン, メチマイシン, ランカマイシン) を不活化し, 2 糖を含む ML (TYL, SPM, カルボマイシン, ジョサマイシン, ニッダマイシン, レロマイシン) を不活化しなかった。興味深いことに, 培養液上清はグリコシル化 OL を再活性化する能力を持ち, グルコース分子の遊離によって生物活性を戻すもう 1 つの酵素活性を持っていた。これら不活化と再活性化という 2 つの酵素活性が OL 生合成経路の必須部分であろうと予測されている<sup>126)</sup>。

**XII.** 人工プラスミドによる薬剤耐性遺伝子の *E. coli* から G (+) 菌へ, そして, 自然界でのマクロライド耐性遺伝子のグラム (+) 球菌から *E. coli* への遺伝子伝達

*E. coli* を含む腸内細菌群は低い ML 耐性を示すが, MLS タイプの高い ML 耐性を示す *E. coli* が ML 経口投与治療前歴のある患者からフランスで分離された<sup>99, 100)</sup>。この株 BM 2570 の伝達性プラスミド pIP 1527 の中に 2 つの ML 耐性遺伝子 (*ereB* と *erxA*) があるが<sup>127)</sup>, この *erxA* 部分に関しては *Enterococcus faecalis* のトランスポゾン Tn 917 (*ereB* 遺伝子) と *Streptococcus sanguis* の pAM 77 (*ermAM* 遺伝子) と比較して, それぞれ 3 アミノ酸と 6 アミノ酸が異なるのみで *ermBC* 遺伝子と改名された。つまり, ほぼ同じ ML 耐性遺伝子がグラム (+) とグラム (-) 菌に存在していたことがわかってきた。

そこで人工的に, プラスミド pBR 322 の複製オリジン, 広範宿主域をもつ streptococcal プラスミド pAM β 1 のオリジン, グラム (-) でも (+) でも KM 耐性を発現でき非相補群 IncP プラスミド RK 2 の伝達オリジンを含む構築プラスミド pAT 187 が作られた。この人工プラスミドはフィルターメイティング法で *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus thuringiensis*, *Listeria monocytogenes* や *Staphylococcus aureus* に  $2 \times 10^{-8}$  から  $5 \times 10^{-7}$  の頻度で伝達した<sup>128)</sup>。

グラム (+) 球菌での MLS 耐性発現にはメチラーゼ構造遺伝子上流のリーダーペプチド領域において, リボ

ソームが立ち往生するかしないかにより, RNA ポリメラーゼによる次の構造遺伝子の転写が続くか否か, ターミネーターによりポリメラーゼが離れてしまうか否かで決まる。この *ermBC* 遺伝子は調節領域の変異が生じており, *E. coli* や *B. subtilis* で構成的 (誘導をかけず) に発現した。*ermBC* 遺伝子とその調整領域は挿入配列 IS 15 右端の最後の 37 bp から下流に位置し, この 37 bp は IS 1 の下流に位置している。グラム (+) 球菌から *E. coli* への遺伝子伝達は IS 15 がはじめに組み込まれてから, 次に IS 1 による転移がおこり, pIP 1527 の伝達性で伝播が起きていると考えられている。実際, *ermBC* 遺伝子に相同な DNA 領域が EM 高度耐性 *E. coli* 21 株や *Klebsiella* 2 株で検出されている。以上より, グラム (+) とグラム (-) 菌の間の遺伝子の行き来が明らかとなっている。

**XIII.** 次なるマクロライド, 今後のマクロライド (15 員環マクロライドのアジスロマイシン, ケトライド, 11,12-カーボネイト誘導体, アシライドなど)

今後の ML の構造修飾に関する新しい方向性についてはよい総説があり<sup>36-39)</sup>, ニュー ML として RXM, Dirithromycin, AZM, CAM, Flurithromycin, ロキタマイシン, ミオカマイシンが述べられている<sup>36)</sup>。ここにも一部述べられているように近年, 有機合成技術の発展による誘導体の次世代新薬開発が注目され, 最近では 14 員環や 16 員環だけでなく 15 員環アザライド系 ML の臨床への登場も近いといわれ, グラム (-) 菌への効果の拡大が注目されている。ここでその AZM の優れた特性を少し紹介する。

AZM (CP 62, 993; 9-deoxy-9 a-methyl-9 a-aza-9 a-homoEM A; XZ-450) は古典的な EM スペクトルを残しながら EM と比べてグラム (-) 菌への抗菌力が著しく改善している。*Haemophilus influenzae* と *Neisseria gonorrhoeae* には EM よりも 4 倍, *Branhaemella catarrhakis*, *Campilobacter* sp. と *Legionella* sp. に関しては 2 倍上昇している。*Chlamydia* spp. に関しては EM に類似している。AZM は腸内細菌科の多くの属に著しく高い力価を示す。*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* や *Yersinia* の MIC<sub>90</sub> は EM 16~128 μg/mL と比較して, AZM では 4 μg/mL 以下であった。AZM は主たるグラム (+) 菌を 1 μg/mL 以下で阻害した。EM 耐性 *Staphylococcus* と *Streptococcus* 分離細菌に対して交差耐性を示した。*Bacteroides fragilis* に関しては適度な活性をもち, 他の嫌気性細菌種では EM と比較しうるものであった。AZM もまた EM と比較して, よりよい殺菌活性をもっていた。AZM の活性機構は AZM が EM と<sup>14</sup>C-EM リボソーム結合部位で競争阻害を示し, 類似していることが示されている<sup>129)</sup>。

新しい酸安定化 15 員環 AZM は経口投与でよく吸収され, 特に長い半減期を示し, とりわけ組織中によく分

布することがマウス、ラット、犬や猿で示されている。AZMの血管透過は組織/プラズマ-曲線下範囲比でEMでは3.1から11.6であることと比較して、13.6から137の幅でよりよい結果が出ている。これらのAZMの著しい薬物動態的特性が一連の動物感染モデルでの優れた効果として表われている。

アモキシシリン耐性 *Haemophilus influenzae* または感受性 *Streptococcus pneumoniae* の鼻腔投与によるネズミ中耳感染において、AZMの経口投与は効果的であり、EMは効果がなく、セファクロールは *H. influenzae* 感染治療にわずかに効果があった。*Streptococcus pneumoniae* に対してはAZMはセファクロールとEMと同じだった。*Fusobacterium necrophorum* によって作られた嫌気性菌感染マウスモデルに関して、AZMはEMや他4抗生物質よりも10倍強力である。同様に、*Salmonella enteritidis* (肝臓とヒ臓)や *Staphylococcus aureus* (太腿筋肉)での組織感染に関してEMは両感染で無効だったが、AZMは効果的であった。AZM, EM, セファクロールの経口や皮下活性は *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans* もしくは *S. aureus* により作った急性感染に関しては類似していたし、一方ではAZMは細胞内病原菌 *Listeria monocytogenes* に関してEMやセファクロールよりも効果的だった。半減期でEMを超えたAZMの薬物動態のよさは *S. aureus* 感染急性マウスモデルの予防治療に明白であった。これらのAZMの性質は皮膚もしくは柔組織や呼吸気病の集団獲得型感染への使用に対する良好さを強く示唆していた<sup>130)</sup>。

さて、最近ではケトライドHMR 3647 (テリスロマイシン)の作用点がEMとは少し異なっており、誘導型MLS耐性菌に有効であると報告されている<sup>131)</sup>。そして、種々の細菌に有効な結果が報告されてきている。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Haemophilus influenzae* 分離株の90%に対して、HMR 3647とHMR 3004はそれぞれ4と2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のMICを示し、両方ともマウスの実験的肺炎モデルに有効であった<sup>132)</sup>。グラム陽性菌に関するケトライド2種、HMR 3647とHMR 3004に関して、*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Streptococcus* spp. の280株に対する試験管内活性が調べられ、EM感受性メチシリン感受性 *S. aureus* の17株がEMより4~16倍低いMICを持つとわかったが、MRSAには効果は見られなかった<sup>133)</sup>。また、*Enterococcus* に関してはEMよりわずかによかった。*Streptococcus* spp. に関してはEMよりずっと優れた活性を持っている。*Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, 非病原性 *Neisseria* 分離株や *Moraxella catarrhalis* に関して、よりよい活性を示し、これら分離株の90%が8~10倍の間でより高く阻害されている<sup>134)</sup>。テリスロマイシンは非 *Bacteroides fragilis* 株に

関しては特にAZM, CAM, EM, RXMと比べもっとも低いMICを示し、時間-殺菌関係は2MICで他の薬剤より殺菌的であった<sup>135)</sup>。

また、最近になって *S. aureus* 細胞でのトランスレーションと50Sリボソームサブユニット形成に関して、11,12-カルボネートMLがCAMやその誘導体などを例にして、11,12-OHのMLと比較してより強く阻害するという特性が報告された。また、ラクトン環3位の置換も重要であり、このような化合物がさらに効果的なMLを作り上げていくことを示唆している。このように、CAMの11,12-カーボネイト誘導体や3-ケトライド型や、そのケトンのアシライド(O-R)へ変換するドラッグデザイン(私信)など、今後のMLの新しい展開を示唆する報告がでてきている<sup>136)</sup>(Fig. 9)。

一方では、前述のようにErm蛋白の構造がNMRやX線解析で明らかにされたことで、リボソームメチラーゼ酵素反応の解析が三次元で論じられるようになり、阻害剤が探せるようになってきた。そして、最近、Erm蛋白阻害剤が具体的に見出されている。NMRを用いた探索法によりErmAM蛋白に弱く結合するトリアジ

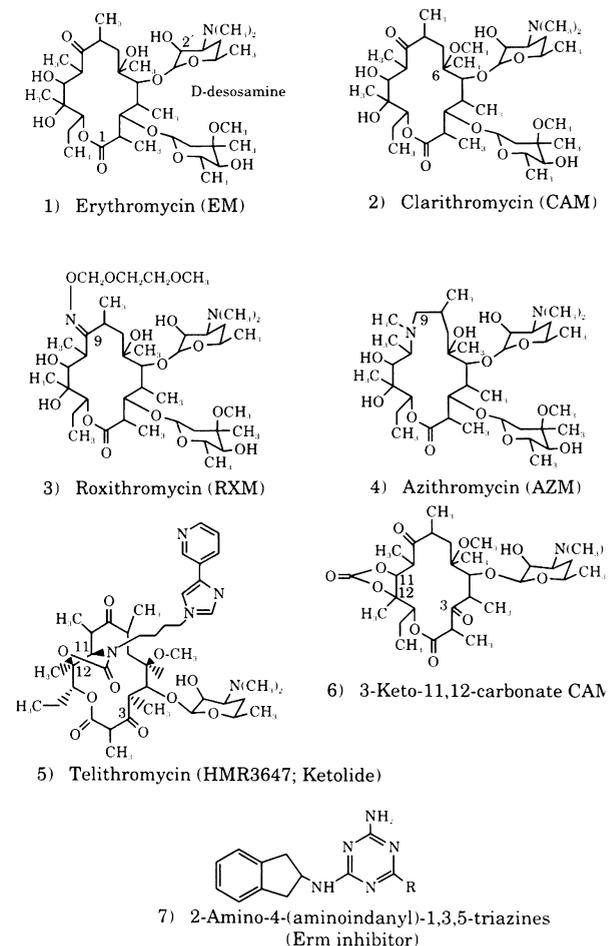


Fig. 9. Structure of erythromycin, new macrolide, future macrolides, and Erm inhibitor.

ン含有化合物がリード化合物としてみだされた。これらの最初のリード化合物は大量の類似体合成によって優れた化合物が選出された。その結果、Erm 蛋白支配の rRNA メチレーションを阻害する化合物 (2-amino-4-(aminoindanyl)-1,3,5-triazines) 類を見出した (Fig. 9)。さらにその阻害剤と酵素の結合様式から、トリアジン環はアデノシル-L-ホモシステイン (SAH) のアデニン類似体 (Fig. 2) として認識されることが明らかとされた。

このようにして、阻害剤の探索が立体構造とのからみから探されはじめており新阻害剤が見出された。そして、これらの化合物は Erm 支配 MLS 型耐性をなくするための新リード化合物として役立つ新規なメチル転移酵素阻害剤であることが示された<sup>137)</sup>。今後はこのような阻害剤探しの戦略が盛んに行われていくに違いない。

#### XIV. 最 後 に

今日の ML 耐性化の傾向としては、一口に言って Table 1 に示したような 10 種の耐性化機構が見ついているなかで、臨床分離株が G (+) と G (-) の間をうまく遺伝子のやりとりをしながら生存をはかっている様子が見られる。10 年ほど昔には ML 不活化は大腸菌などの腸内細菌のみと考えられていたが、今日ではブドウ球菌にも *ere* や *mph* 遺伝子が発見されている。また、日本では G(-) 菌ではまだ見出されていない *erm* 遺伝子はヨーロッパではどの細菌にも蔓延している。Mycobacterium の長期使用に伴って最近ではリボソーム塩基変異株やリボソーム蛋白変異株が登場し、臨床分離株はますます多様化して ML の抗菌作用から身を守ろうとしている風である。

一方、研究者側も黙って見ているわけではなくさらなる新 ML 開発や Erm の立体構造からその阻害機構を考察し、対抗手段を考えつつある。経口 ML 薬は腸管内濃度が非常に高くなり、このため腸内細菌は厳しい生存条件下におかれるために、腸内細菌から最初に高活性の ML 不活化酵素 (EM エステラーゼやマクロライド 2'-リン酸化酵素) の存在が発見されたのかもしれない。

近年は ML 使用量が増え、日本での EM 高度耐性大腸菌の出現が増加してきており、臨床分離株での今後の ML 耐性の変化について注目していかなければならない新しい時期を迎えている。

また、このところ ML 不活化酵素による耐性株の報告が *E. coli* 以外の細菌でも増えつつあり、その耐性化機構が次第に明らかにされてきている。そして、国内外ではこれらの菌やその耐性機構および不活化酵素を利用した新しいドラッグデザインへの模索がはじまっている。

現在では多種大量の化学療法剤を使っている病院のなかで、臨床細菌が多剤耐性化したのみならず、1 薬剤に対する耐性遺伝子をも複数持ち込んでいる。こうして、

多重化耐性遺伝子を保有する細菌が選択されて、進化し生き残っていく手段がみうけられる。

今後、ドクターが抗菌薬を使う際には、いままでのように菌種同定、MIC、使用時期のみならず、他剤との併用効果の有有用性<sup>138)</sup>なども患者の病態と共に総合的に考えあわせることが必要である。その面からも、一方で薬剤の MIC をより早く臨床に反映させる必要性から、ATP-ルシフェラーゼ反応を応用した 3.5 時間判定改良法などが考案されている<sup>139)</sup>。

以上、難治性化の傾向を考慮にいれながら、ドクターはより切れ味のよい治療法を考案していくと共に、さらに今後登場してくる新 ML の特色をよく考えながらますます注意して使いわけねばならない。すなわち、耐性菌の進化に対抗する新しい ML の戦いの時代がきていると思われる。

#### 謝 辞

総説を書く機会をいただいた編集委員長の柴 孝也教授に厚く御礼申し上げます。また、原稿をまとめるにあたってご助力ご協力いただいた千葉大学薬学部澤井哲夫教授および中村昭夫、鶴淵和恵、仲澤今日子、都澤いずみ、水越聡子、右京芳文の各氏に感謝いたします。また、Dr. Sutcliffe J 氏ら (28 回薬剤耐性菌シンポジウム講演記録, 1999) の引用許可に感謝いたします。また、著者のマクロライドに関する 1999 年の研究は平成 11 年度厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 「細菌の薬剤耐性機構の分子解析と耐性機序別迅速検出法に関する研究」によって助成されたもので、厚生省に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Nakajima H, Tojo T, Greenberg J: Interaction of the expression of two membrane genes, *acrA* and *pls*, in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 122: 874~879, 1975
- 2) 佐藤久美子, 柴山恵吾, 堀井俊伸, 他: 大腸菌におけるマクロライド系抗生物質自然耐性の機構。日本細菌学会雑誌 53: 176, 1998
- 3) Leclercq R, Courvalin P: Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1267~1272, 1991
- 4) Leclercq R, Courvalin P: Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1273~1276, 1991
- 5) 小原康治: 難知性の諸因子一症例, 薬剤耐性, 宿主側の因子 (1) 薬剤の不活化による耐性一。化学療法の領域 *Antibiotics & Chemotherapy* (医薬ジャーナル社), 7 (7): 33~46, 1991
- 6) Weisblum B: Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(3): 577~585, 1995
- 7) 中島良徳: 抗生物質マクロライドの魅力一構造と機能の観点から一。日本細菌学雑誌 50: 717~736, 1995

- 8) 中島良徳: 抗菌剤耐性機構研究の進展・マクロライド薬耐性。化学療法の領域 12: 1257~1264, 1996
- 9) 小原康治: 「耐性菌感染症の理論と実際(平松啓一編)」II. 耐性のメカニズムと疫学。7. 最近のマクロライド耐性。医薬ジャーナル社: 96~100, 1998
- 10) Weisblum B: Macrolide resistance. Drug Resistance Updates 1: 29~41, 1998
- 11) Nakajima Y: Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. J. Infect. Chemother. 5: 61~74, 1999
- 12) 小原康治: 「マクロライド薬の新しい展開」, 8. マクロライド薬の作用機序。(編者: 松本文夫, 中山一誠), (株)メヂカルアシスト, (印刷中), 2000
- 13) Homma H, Yamanaka A, Tanimoto S, et al.: Diffuse panbronchiolitis: A disease of the transitional zone of the lung. Chest 83: 63~69, 1983
- 14) 澤木政好, 三上理一郎, 三笠桂一, 他: 慢性下気道感染症における erythromycin 長期化学療法の検討。感染症誌 60: 45~50, 1986
- 15) Mikasa K, Sawaki M, Konishi M, et al.: The usefulness of long-term treatment with erythromycin for incurable chronic lower respiratory tract infections. Chemotherapy (Tokyo) 40: 647~653, 1992
- 16) 工藤翔二: 「炎症・免疫とマクロライド, UP TO DATE シリーズ 2」, マクロライド新作用研究の進歩と課題。pp.13~19. (監修: 清水喜八郎, 大村 智, 編集責任: 工藤翔二), 医薬ジャーナル社, 1999. 8.1
- 17) Fernandes A C, Anderson R, Theron A J, et al.: Enhancement of human polymorphonuclear leukocyte motility by erythromycin in vitro and in vivo. S. Afr. Med. J. 66: 173~177, 1984
- 18) Frascini F, Scaglione F, Ferrara F, et al.: Evaluation of the immunostimulating activity of erythromycin in man. Chemotherapy (Tokyo) 32: 286~290, 1986
- 19) Kita E, Sawaki M, Nishikawa F, et al.: Enhanced interleukin production after long-term administration of erythromycin stearate. Pharmacology 41: 177~183, 1990
- 20) Kita E, Sawaki M, Oku D, et al.: Suppression of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by erythromycin. J. Antimicrob. Chemother. 27: 273~284, 1991
- 21) Hirakata Y, Kaku M, Tomono K, et al.: Efficacy of erythromycin lactobionate for treating *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1198~1203, 1992
- 22) Hirakata Y, Kaku M, Mizukane R, et al.: Potential effects of erythromycin on host defense system and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1922~1927, 1992
- 23) Tateda K, Hirakata Y, Furuya N, et al.: Effects of sub-MICs of erythromycin and other macrolide antibiotics on serum sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 675~680, 1993
- 24) Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, et al.: Direct evidence for antipseudomonal activity of macrolides: exposure-dependent bactericidal activity and inhibition of protein synthesis by erythromycin, clarithromycin, and azithromycin. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2271~2275, 1996
- 25) 小原康治, 中川将仁, 川辺哲寛, 他: エリスロマイシンとロキタマイシン前処理による緑膿菌のアミノグリコシド不活化酵素への影響。Jpn. J. Antiboit. 50 (Suppl. A): 92~94, 1997
- 26) Thomas R S, Joel E M, Michael B: The effects of macrolide on the expression of bacterial virulence mechanisms. J. Antimicrob. Chemother. 41: 505~512, 1998
- 27) Sassa K, Mizushima Y, Kobayashi M: Differential Modulatory Effects of Clarithromycin on the Production of Cytokines by a Tumor. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2787~2789, 1999
- 28) Kohyama T, Takizawa H, Kawasaki S, et al.: Fourteen-member macrolides inhibit interleukin-8 release by human eosinophils from atopic donors. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 907~911, 1999
- 29) Aoki Y, Kao P N: Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF- $\kappa$ B, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2678~2684, 1999
- 30) 内藤泰代, 中村昭夫, 小原康治, 他: マクロライドによる緑膿菌由来 APH (3') 酵素の選択的活性抑制効果。Jpn. J. Antiboit. 52 (Suppl. A): 143~145, 1999
- 31) 小原康治, 中村昭夫, 澤井哲夫: 「炎症・免疫とマクロライド, UP TO DATE シリーズ 2」 VII. 細菌機能のモジュレーション。4. マクロライドによる緑膿菌由来アミノ配糖体 3'-リン酸化酵素の選択的活性抑制効果。(監修: 清水喜八郎・大村 智, 編集責任: 工藤翔二), 医薬ジャーナル社: 163~171, 1999
- 32) 中村昭夫, 内藤泰代, 仲澤今日子, 他: マクロライドによるアミノ配糖体 3'-リン酸化酵素の選択的活性抑制—マクロライド耐性菌を用いての検討—。Jpn. J. Antiboit. 53 (Suppl. A): 28~31, 2000
- 33) Gilligan P H: Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin. Microb. Rev. 4: 35~51, 1991
- 34) Jaffe A, Francis J, Rosenthal M, et al.: Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. Lancet. 351: 420, 1998
- 35) Altschuler E L: Azithromycin, the multidrug-resistant protein, and cystic fibrosis. Lancet. 351: 1286, 1998
- 36) Kirst H A, Side G D: New directions for macrolide antibiotics: Structural modifications and in vitro activity. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1413~1418, 1989
- 37) Kirst H A, Side G D: New directions for macrolide antibiotics: Pharmacokinetics and clinical efficacy. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1419~1422, 1989
- 38) Kirst H A: Section III.— Chemotherapeutic Agents. Chapter 13. Macrolide antibiotics. In Annual Reports in Medicinal Chemistry—25, p.119~128, Academic Press, Inc., 1989
- 39) Kirst H A: Structural modification of macrolide antibiotics. In Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics. p.39~63, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990
- 40) Andremont A, Tancrede C: Reduction of the aerobic gram-negative bacterial flora of the gastrointestinal

- tract and prevention of traveller's diarrhea using oral erythromycin. *Ann. Microbiol. (Paris)* 132 B: 419~427, 1981
- 41) Andremont A, Railbaud P, Tancrede C: Effect of erythromycin on microbial antagonisms: a study in gnotobiotic mice associated with a human fecal flora. *J. Infect. Dis.* 148: 579~587, 1983
- 42) Andremont A, Sancho-Garnier H, Tancrede C: Epidemiology of intestinal colonization by members of the family *Enterobacteriaceae* highly resistant to erythromycin in a hematology-oncology unit. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 1104~1107, 1986
- 43) 中村昭夫, 谷口和夫, 鶴淵和恵, 他: 1996年臨床分離メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* のマクロライド抗生剤耐性。 *Jpn. J. Antibiot.* 51 (7): 494~500, 1998
- 44) Hansen L H, Mauvais P, Douthwaite S: The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23 S ribosomal RNA. *Mol. Microbio.* 31: 623~631, 1999
- 45) Xiong L, Shah S, Mauvais P, et al.: A ketolide resistance mutation in domain II of 23 S rRNA reveals the proximity of hairpin 35 to the peptidyl transferase centre. *Mol. Microbio.* 31: 633~639, 1999
- 46) Roberts M C, Sutcliffe J, Courvalin P, et al.: Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (12): 2823~2830, 1999
- 47) Denoya C, Dubnau D: Mono- and dimethylating activities and kinetic studies of the *ermC* 23 SrRNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 264: 2615~2624, 1989
- 48) Monod M, Denoya C, Dubnau D: Sequence and properties of pIM 13, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance plasmid from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 167: 138~147, 1986
- 49) Monod M, Denoya C, Dubnau D: Sequence and properties of p IM 13, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance plasmid from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 167: 138~147, 1986
- 50) Denoya C, Dubnau D: Mono- and dimethylating activities and kinetic studies of the *ermC* 23 SrRNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 264: 2615~2624, 1989
- 51) Clancy J, Schmieder B J, Petitpas J W, et al.: Assays to detect and characterize synthetic agents that inhibit the ErmC methyltransferase. *J. Antibiot.* 48: 1273~1279, 1995
- 52) Bussiere D E, Muchmore S W, Dealwis C G, et al.: Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry* 37: 7103~7112, 1998
- 53) Schluckebier G, Zhong P, Stewart K D, et al.: The 2.2 Å structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* 289: 277~291, 1999
- 54) Schluckebier G, Zhong P, Stewart K D, et al.: The 2.2 Å structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* 289: 277~291, 1999
- 55) Douthwaite S, Aagaard C: Erythromycin binding is reduced in ribosomes with conformational alterations in the 23 S rRNA peptidyl transferase loop. *J. Mol. Biol.* 232: 725~731, 1993
- 56) Weisblum B: Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (4): 797~805, 1995
- 57) Eady E A, Ross J I, Tipper J L, et al.: Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 211~217, 1993
- 58) Clewell D B, Yagi Y, Dunny G M, et al.: Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: Identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J. Bacteriol.* 117: 283~289, 1974
- 59) Westh H, Hougaard D M, Vuust J, et al.: Prevalence of *erm* gene classes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated between 1959 and 1988. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 369~373, 1995
- 60) Matsuoka M, Endou K, Saitoh S, et al.: A mechanism of resistance to partial macrolide and streptogramin B antibiotics in *Staphylococcus aureus* clinically isolated in Hungary. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 1482~1486, 1995
- 61) Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et al.: Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2562~2566, 1996
- 62) Wondrack L, Massa M, Yang B V, et al.: Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 992~998, 1996
- 63) Matsuoka M, Endou K, Kobayashi H, et al.: A dynamic plasmid that shows MLS and PMS resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 148: 91~96, 1997
- 64) Matsuoka M, Endou K, Kobayashi H, et al.: A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 221~227, 1998
- 65) Shortridge V D, Falmm R K, Ramer N, et al.: Novel mechanism of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 73~78, 1996
- 66) Clancy J, Petitpas J, Dib-Haji F, et al.: Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* 22: 867~879, 1996
- 67) Nelson C T, Mason E O Jr, Kaplan S L: Activity of oral antibiotics in middle ear and sinus infections caused by penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: implications for treatment. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13: 585~589, 1994
- 68) Tait-Komradt A, Clancy J, Cronan M, et al.: *mefE*

- is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2251~2255, 1997
- 69) 紺野昌俊, 生方公子: VII.  $\beta$ -ラクタム系薬とマクロライド系薬耐性機構。(改訂) ペニシリン耐性肺炎球菌, (編者: 紺野昌俊, 生方公子), (株)協和企画通信: 97~11, 1997
- 70) Sutcliffe J, Appelbaum P, Brennan L, et al.: Resistance mechanisms of macrolide-resistant bacteria. 第28回薬剤耐性菌シンポジウム講演記録: 10~15, 1999
- 71) Azavedo J C S, Yeung R H, Bast D J, et al.: Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of group A Streptococci from Ontario, Canada. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 2144~2147, 1999
- 72) Clancy J, Dib-Hajj F, Petitpas W J, et al.: Cloning and Characterization of a Novel Macrolide Efflux Gene, *mreA*, from *Streptococcus agalactiae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 41: 2719~2723, 1997
- 73) Clarebout G, Leclercq R: The macrolide resistance gene *mreA* of *Streptococcus agalactiae* is ubiquitous in this bacterial species. ICAAC Abst. No.0840. p.115, 1999
- 74) Gregory S T, Dahlberg A E: Erythromycin mutations in Ribosomal proteins L 22 and L 4 perturb the higher order structure of 23 S Ribosomal RNA. J. Mol. Biol. 289: 827~834, 1998
- 75) Gregory S T, Dahlberg A E: Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L 22 and L 4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA. J. Mol. Biol. 289: 827~834, 1999
- 76) Taylor Y W: Characterization of erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1989~1996, 1991
- 77) Murphy G S Jr, Echeverria P, Jackson L R, et al.: Ciprofloxacin- and azithromycin-resistant *Campylobacter* causing traveler's diarrhea in U.S. troops deployed to Thailand in 1994. Clin Infect Dis 22: 868~869, 1996
- 78) Burnens A P, Heitz M, Brodard I, et al.: Sequential development of resistance to fluoroquinolones and erythromycin in an isolate of *Campylobacter jejuni*. Zentralb Bakteriell 283: 314~321, 1996
- 79) Aarestrup F M, Nielsen E M, Madsen M, et al.: Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, broilers in Denmark. Antimicrob. Agents Chemother 41: 2244~2250, 1997
- 80) Meier A, Kirschner P, Springer B, et al.: Identification of mutations in 23 S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. Antimicrob. Agents Chemother. 38 (2): 381~384, 1994
- 81) Sander P, Meier A, Botter E C: Ribosomal drug resistance in mycobacteria. Res. Microbiol. 26: 469~480, 1996
- 82) Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al.: Mutations in 23 S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 477~480, 1996
- 83) Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Popularie F, et al.: Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob. Agents Chemother 41: 2724~2729, 1997
- 84) Brown B A, Wallace R J Jr, Onyi G O, et al.: Activities of four macrolides, including clarithromycin, against *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and *M. chelonae*-like organisms. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 181~184, 1992
- 85) Wallace R J Jr, Meier A, Brown B A, et al.: Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob. Agents Chemother. 40 (7): 1676~1681, 1996
- 86) Meier A, Heifets L, Wallace R J Jr, et al.: Molecular mechanisms of clarithromycin resistance in *Mycobacterium avium*: Observation of multiple 23 S rRNA mutations in a clonal population. J. Infect. Diseases. 174: 354~360, 1996
- 87) Sander P, Prammananan T, Meier A, et al.: The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance. Molecular Microbiol. 26 (3): 469~480, 1997
- 88) Sander P, Bottger E C: Mycobacteria: Genetics of resistance and implications for treatment. Chemotherapy 45: 95~108, 1999
- 89) Sander P, Bottger E C: Mycobacteria: Genetics of resistance and implications for treatment. Chemotherapy. 45: 95~108, 1999
- 90) Guay D R: Macrolide antibiotics in paediatric infectious diseases. Drugs 51: 515~536, 1996
- 91) Andreumont A, Tancrede C: Reduction of the aerobic gram-negative bacterial flora of the gastrointestinal tract and prevention of traveller's diarrhea using oral erythromycin. Ann. Microbiol. (Paris) 132 B: 419~427, 1981
- 92) Courvalin P, Ounissi H, Arther M: Multiplicity of macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotic resistance determinants. J. Antimicrob. Chemother. 16: Suppl. A 91~100, 1985
- 93) Andreumont A, Railbaud P, Tancrede C: Effect of erythromycin on microbial antagonisms: A study in gnotobiotic mice associated with a human fecal flora. J. Infect. Dis. 148: 579~587, 1985
- 94) Barthelemy P, Autisser D, Gerbaud G, et al.: Enzymatic hydrolysis of erythromycin by *Escherichia coli*. A new mechanism of resistance. J. Antibiot. 37: 1692~1696, 1984
- 95) Ounissi H, Courvalin P: Nucleotide of the gene *ereA* encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*. Gene 35: 271~278, 1985
- 96) Arthur M, Andreumont A, Courvallin P: Heterogeneity of genes conferring high-level resistance to erythromycin by inactivation in Enterobacteria. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 137 A: 125~134, 1986
- 97) Arthur M, Autisser D, Courvalin P: Analysis of the nucleotide sequence of the *ereB* gene encoding the erythromycin esterase type II. Nucleic Acids Re-

- search 14: 4987~4999, 1986
- 98) Andremont A, Gerbaud G, Courvalin P: Plasmid mediated high level resistance to erythromycin in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 515~518, 1986
- 99) Arther M, Courvalin P: Contribution of two different mechanisms to erythromycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 694~700, 1986
- 100) Andremont A, Sancho-Garnier H, Tancrede C: Epidemiology of intestinal colonization by members of the family *Enterobacteriaceae* highly resistant to erythromycin in a hematology-oncology unit. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 1104~1107, 1986
- 101) Arthur M, Andremont A, Courvalin P: Distribution of erythromycin esterase and rRNA methylase genes in members of the family *Enterobacteriaceae* highly resistant to erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 404~409, 1987
- 102) O'Hara K, Kanda T, Kono M: Structure of a phosphorylated derivative of oleandomycin, obtained by reaction of oleandomycin with an extract of an erythromycin-resistant strain of *Escherichia coli*. *J. Antibiot.* 41: 823~827, 1988
- 103) O'Hara K, Kanda T, Ohmiya K, et al.: Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of *Escherichia coli* that is highly resistant to erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (8): 1354~1357, 1989
- 104) O'Hara K, Noguchi N, Ebisu T, et al.: Mobilization and cloning of a macrolide 2'-phosphotransferase I gene, *mph* (2')I, from *Escherichia coli* Tf 481 A. Program and Abstract of The 30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p.224, 1990
- 105) Kono M., O'Hara K, Ebisu T: Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase type II from a strain of *Escherichia coli* highly resistant to macrolide antibiotics. *FEMS Microb. Lett.* 97: 89~94, 1992
- 106) 小原康治: マクロライド系抗生物質 2'-誘導体に対する大腸菌由来マクロライド 2'-リン酸化酵素の反応機構。 *Jap. J. Antibiot.* 46: 818~826, 1993
- 107) Parker C E, Perkins J R, Tomer K B, et al.: Application of nanoscale packed capillary liquid chromatography (75 mm i.d.) and capillary zone electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry to the analysis of macrolide antibiotics. *J. Am. Soc. Mass Spectro.* 3: 563~574, 1992
- 108) Shida Y, Deterding L J, O'Hara K, et al.: Macrolide antibiotics structure determination by fast atom bombardment/tandem mass spectrometry. *Tetrahedron* 49: 9221~9234, 1993
- 109) Shida Y, Fukuzawa M, Yamamoto K, et al.: ESI/MS studies on macrolide antibiotics phosphorylated by an extract of an erythromycin resistant-*Escherichia coli*. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 44 (2): 261~267, 1996
- 110) O'Hara K: Application of nuclear magnetic resonance spectrometry to measure the activity of bacterial macrolide esterase. *Microbios* 79: 231~239, 1994
- 111) 小原康治, 神田稔久, 松山秀明, 他: オレアンドマイシン (OL), OL 2'-リン酸化物, OL エステル分解物の D<sub>2</sub>O 中での 2D-NMR による全 <sup>1</sup>H または <sup>13</sup>C ケミカルシフトの決定。 *Jap. J. Antibiot.* 48: 437~441, 1995
- 112) O'Hara K, Yamamoto K.: Reaction of roxithromycin and clarithromycin with macrolide-inactivating enzymes from highly erythromycin-resistant *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (4): 1036~1038, 1996
- 113) Noguchi N, Emura A, Matsuyama H, et al.: Nucleotide sequence and characterization of an erythromycin-resistance determinant that encodes macrolide 2'-phosphotransferase I in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2359~2363, 1995
- 114) Noguchi N, Katayama J, O'Hara K: Cloning and nucleotide sequence of the *mph B* gene for macrolide 2'-phosphotransferase II in *Escherichia coli*. *FEMS Microb. Lett.* 144: 197~202, 1996
- 115) Kim S-K, Baek M-C, Choi S-S, et al.: Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Escherichia coli mphK* gene encoding macrolide-phosphotransferase K. *Mol. Cell.* 6: 153~160, 1996
- 116) Katayama J, Okada H, O'Hara K, et al.: Isolation and characterization of two plasmids that mediate macrolide resistance in *Escherichia coli*: Transferability and molecular properties. *Biol. Pharm. Bull.* 21(4): 326~329, 1998
- 117) Taniguchi K, Nakamura A, Turubuchi K, et al.: Identification of *Escherichia coli* clinical isolates producing macrolide 2'-phosphotransferase by a highly sensitive detection method. *FEMS Microb. Lett.* 167 (2): 191~195, 1998
- 118) Taniguchi K, Nakamura A, Tsurubuchi K, et al.: Appearance of macrolide highly-resistant *Escherichia coli* producing macrolide 2'-phosphotransferase II in Japan. *Microbios* 97: 137~144, 1999
- 119) Taniguchi K, Nakamura A, Tsurubuchi K, et al.: Identification of functional amino acids in macrolide 2'-phosphotransferase II. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (8): 2063~2065, 1999
- 120) Yazawa K, Mikami Y, Sakamoto T, et al.: Inactivation of the macrolide antibiotics erythromycin, midcamycin, and rokitamycin by pathogenic *Nocardia* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2197~2199, 1994
- 121) Wiley P F, Baczynskyj L, Lester A, et al.: Enzymatic phosphorylation of macrolide antibiotics 40: 195~201, 1987
- 122) Wiley P F, Baczynskyj L, Dolak L A, et al.: Enzymatic phosphorylation of macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* 90: 195~201, 1987
- 123) Marshall V P, Cialdella J I, Baczynskyj L, et al.: Microbial O-phosphorylation of macrolide antibiotics. *J. Antibiot.* 92: 132~134, 1989
- 124) Kuo M, Chirby D G, Argoudelis A D, et al.: Microbial glycosylation of erythromycin A. *Antimi-*

- crob. Agents Chemother 33: 2089~2091, 1989
- 125) Fierro J F, Hardisson C, Salas J A: Resistance to oleandomycin in *Streptomyces antibioticus*, the producer organism. J. Gen. Microbiol. 133: 1931~1939, 1987
- 126) Vilches C, Hernandez C, Mendez C, et al.: Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism, *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol, 174: 161~165, 1992
- 127) Brisson-Noel A, Arthur M, Couvalin P: Evidence for natural gene transfer from Gram-positive cocci to *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170: 1739~1745, 1988
- 128) Trieu-Cuot P, Carlier C, Martin P, et al.: Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. FEMS Microbial. Lett. 48: 289~294, 1987
- 129) Retsema J, Girard A, Schelkly W, et al.: Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1939~1947, 1987
- 130) Girard A, Girard D, English A, et al.: Pharmacokinetic and in vivo studies with azithromycin (CP-62,993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1948~1954, 1987
- 131) Hamilton-Miller J M T, Shah S: Resistance phenotypes in Staphylococci to Macrolides, lincosamides, ketokide, and streptogramines. ICAAC, Session 122, C 2 No.1227, p.159, 1999
- 132) Piper K E, Rouse M S, Steckelberg J M, et al.: Ketolide treatment of *Haemophilus influenzae* experimental pneumoniae. Antimicrob. Agents Chemother 43: 708~710, 1999
- 133) Malathum K, Coque T M, Singh K V, et al.: In vitro activities of two ketoles HMR 3647 and HMR 3004, against gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemother 43: 930~936, 1999
- 134) Saez-Nieto J A, Vazquez J A: In vitro activities of ketolides HMR 3647 and HMR 3004, levofloxacin, and other quinolones and macrolides against *Neisseria* spp. and *Moraxella catarrhalis*. Antimicrob. Agents Chemother 43: 983~984, 1999
- 135) Credito K L, Ednie L M, Jacobs M R, et al.: Activity of telithromycin (HMR 3647) against anaerobic bacteria compared to those of eight other agents by time-kill methodology. Antimicrob. Agents Chemother 43: 2027~2031, 1999
- 136) Champney W S, Tober C L: Superiority of 11, 12 carbonate macrolide antibiotics as inhibitors of translation and 50 S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells. Current Microbiol. 38: 342~348, 1999
- 137) Hajduk P J, Dinges J, Schkeryantz J M, et al.: Novel inhibitors of erm methyltransferases from NMR and parallel synthesis. J. Med. Chem. 42: 3852~3859, 1999
- 138) 小原康治, 中村昭夫, 重信普律, 他: 臨床分離肺炎桿菌に対するホスホマイシンと $\beta$ -ラクタム剤, アミノ配糖体剤, マクロライド剤との併用効果. Jpn. J. Antibiot. 50: 704~710, 1997
- 139) Hattori N, Nakajima M, O' Hara K, et al.: Novel antibiotic susceptibility tests by the ATP-bioluminescence method using filamentous cell treatment. Antimicrob. Agents Chemother. 42 (6): 1406~1411, 1998

## Up-to-date report on the resistance of macrolide antibiotics and future macrolides

Koji O' Hara

Division of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University,  
1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

For macrolide antibiotic resistance on the clinical isolates, it is enough to remember only that (1) macrolide antibiotics come to be unable to bind to ribosome and become resistant due to the modification of the ribosomal target site in the 23 SrRNA in the 50 S subunit of 70 S ribosome by N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-dimethylase, before 30 years. Recently, however, the macrolide resistance mechanism has diversified due to the various kinds of macrolide development starting from erythromycin. Macrolide-resistant strains have evolved extremely by using large amounts of macrolides and new macrolides. The details of the dimethylational mechanism and new resistance mechanisms come to light together with the advance of recent study using biotechnology. Addition to these resistance mechanism are known as follows: (2) basic mutation of multiple sites in the 23 SrRNA, (3) mutation of ribosomal protein in the 50 S subunit and elsewhere, (4) macrolide efflux protein, (5) changes in macrolide permeability, (6) inactivation of erythromycin esterase, (7) macrolide 2'-phosphotransferase, (8) inactivating mechanism due to the macrolide 2'-glycosylation, (9) reduction of macrolide formyl group, and (10) resistance due to macrolide deacylation. There are many subgroups, and they are specific to each strain and also to each bacterial species. Faced with the problem of the emergence of various kinds of macrolide resistance, it is expected that new macrolides (15-member-ring macrolide such as azithromycin and 14-member-ring macrolide such as ketolide) will appear in the future. A new battle between the new macrolides and resistant strains showing the new mechanism is now going to start over again, and then macrolide resistance strains must be obliged to generate newly evolution of macrolide resistance mechanism (s).