

Serratia marcescens由来のCarbapenem薬耐性 plasmidの分離と解析

代居, 敬子
代居内科胃腸科医院

<https://doi.org/10.15017/7239372>

出版情報：福岡醫學雑誌. 87 (5), pp.116-126, 1996-05-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



Serratia marcescens 由来の carbapenem 薬耐性 plasmid の分離と解析

代居内科胃腸科医院 (紹介教授: 天児和暢教授)

代 居 敬 子

Analysis of Carbapenem Resistant Plasmid Isolated from *Serratia marcescens*

Takako YOSUE

Yosue Medical Clinic for Stomach and Intestinal Illness
Moji Kitakyushu City, Fukuoka 801

Abstract Four nontransferable plasmids of about 28-32 kbp were isolated in 120 *Serratia marcescens* strains isolated from patients with urinary tract infection. All of these plasmids were transformable in *Escherichia coli*, and showed a high frequency of mobilization by R9-5 plasmid of incompatibility group F II. The MICs of carbapenems were significantly lower than those of cephalosporins. This trend was more marked when MICs were determined at 10^8 cfu/ml.

Based on the substrate profiles and on the effect of inhibitors of the β -lactamase, the enzyme was classified as a class B β -lactamase, so called carbapenemase. The carbapenem resistance genes of these 4 plasmids were cloned into vector plasmid pHSG398 using *Bam* H1 digestion and the size of the DNA was found to be 4.9 kb.

はじめに

本邦では、1983 年以降 *Pseudomonas aeruginosa* や種々のグラム陰性菌にまで抗菌力の広がった β -lactam 薬である、いわゆる第三世代 cephalosporin 系薬が、1984 年には quinolone 薬が³⁹⁾、さらに 1987 年には初めての carbapenem 系薬としての imipenem がそれぞれ臨床応用され今日に至っている¹³⁾。ところが、これら新しい、cephalosporin 系薬の使用は、methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) の増加とそれによる院内感染など多くの問題をもたらした⁵⁾¹⁸⁾²¹⁾³⁴⁾。

一方、欧米諸国では、抗菌スペクトルの広い cephalosporin 系薬の使用によって penicillin 系薬と cephalosporin 系薬を同時に加水分解する extended spectrum β -lactamase (ESBL) による耐性菌出現の問題が報告されている²³⁻²⁴⁾³⁵⁾。これらの ESBL は、TEM-1 や SHV-1 型と呼ばれている β -lactamase の構造遺伝子中の DNA 塩基配列が 1 ないし数個変わることにより、それぞれ基質特異性が拡大した変異菌

である²⁾²⁴⁾。腸内細菌科の中でも、*Serratia marcescens* は種々の抗菌薬に対して耐性を示すが、その分離率は、1983 年 (2.9%)、1987 年 (2.1%)、1990 年 (2.6%)、1992 年 (2.9%) であり、*P. aeruginosa* や *S. aureus* に比べて分離率は高くはない。これは、*S. marcescens* は β -lactam 薬耐性の主因である β -lactamase の産生能、あるいは β -lactam 薬や quinolone 薬に対する *in vitro* 耐性獲得頻度が他の腸内細菌科の菌種に比べて高いため、抗菌薬使用に伴う菌数の急激な減少がおこらないことに起因していると考えられる³⁾¹²⁾³⁵⁾³⁹⁻⁴⁰⁾。

本邦では、1993 年には imipenem に加えて panipenem が、さらに 1995 年 9 月には meropenem が臨床応用された²⁰⁾³²⁾。これら carbapenem 薬の臨床応用が、今後臨床分離細菌の各菌種に如何なる影響を与えるかを知るため、まず 1992 年から 1993 年分離の慢性尿路感染症由来の *S. marcescens* についての carbapenem 薬の感受性動向を検討した。その結果、imipenem や panipenem³⁹⁾ などに対する耐性を保有する plasmid を検出した。

実験材料と方法

使用菌株

実験に使用した 120 株の *S. marcescens* は主として慢性尿路感染症由来の臨床材料から 1992 年から 1993 年にかけて分離されたものである。なおこれらの菌株の同定法は通常の方法に従った。また, plasmid の解析に用いた *Escherichia coli* は K 12 由来の ML 4901 株および ML 4953 株である。その他不和合性群 (incompatibility group, inc) の判明した F-(TC), R 9-5, RP 4-1, N 3, R 27 などの各 plasmid を用いたが, これらの菌株はいずれも北里大学医学部微生物学教室保存株を用いた⁴⁾³¹⁾。さらに DNA 解析を行うための vector plasmid として pHSG 398 を, carbapenem 薬耐性の解析のための対照として pMS 350 由来の cloning plasmid pMS 361 を用いた⁷⁾¹⁷⁾³⁶⁾ (Table 1)。

使用培地

使用菌株の培養は, 感受性測定用ブイヨン (ST プロス, 日水) を用い, 35°C, 18 時間培養した。また, 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は, 感受性ディスク用培地-N (SD-N, 日水) を用いた⁷⁾⁴¹⁾。その他, plasmid の不和合性群の決定や cloning 株の純培養には BTB 乳糖寒天培地 (日水) を, β -lactamase を測定するための菌の培養は Brain Heart Infusion (BHI, Difco) プロスをそれぞれ用いた。

使用薬剤

使用抗菌薬は, それぞれの製造元から力価の判明した原末の分与を受けた。即ち, β -lactam 薬の penicillin 系薬としては piperacillin (PIPC) と ampicillin (ABPC, 富士化学), cephalosporin 系薬として cephalothin (CET, 塩野義製薬), cefotiam (CTM, 武田薬品), cefmetazole (CMZ, 三井), cefoperazone (CPZ, 富士化学), cefotaxime (CTX, ヘキストジ

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Designation	Relevant markers	Source, derivation
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> K12		
ML4901	F ⁻ , <i>ga</i> /K2 <i>ga</i> /T22 <i>hsdR</i> / <i>ac</i> Y1 <i>met</i> B1 <i>re</i> /A <i>sup</i> E44 NA25	NA mutant from x1037 (R. Curtis III)
ML4947	F ⁻ , <i>ga</i> /K2 <i>ga</i> /T22 <i>hsdR</i> <i>hsdM</i> / <i>ac</i> Y1 <i>met</i> B1 <i>re</i> /A <i>sup</i> E44 Rf100	Rf mutant from x1038 (R. Curtis III)
ML4953	F ⁻ , <i>amp</i> /D <i>ga</i> /K2 <i>ga</i> /T22 <i>hsdR</i> <i>hsdM</i> / <i>ac</i> Y1 <i>met</i> B1 <i>re</i> /A <i>sup</i> E44 Rf100	<i>amp</i> D mutant from ML4947 (17)
<i>S. marcescens</i>		
KU971	Clinical isolates in Japan, carbapenem resistance	This paper
KU972	Clinical isolates in Japan, carbapenem resistance	This paper
KU973	Clinical isolates in Japan, carbapenem resistance	This paper
KU974	Clinical isolates in Japan, carbapenem resistance	This paper
Plasmids		
pKU61	Clinical isolates from KU971, inc H	This paper
pKU62	Clinical isolates from KU972, inc H	This paper
pKU63	Clinical isolates from KU973, inc H	This paper
pKU64	Clinical isolates from KU974, inc H	This paper
pMS350	Clinical isolates from <i>P. aeruginosa</i>	(36)
pMS361	pHSG398 with insertion of 4.1 kb fragment of pMS350	This paper (S. Iyobe)
pHSG398	Vector plasmid for cloning	Takara Shuzo Co., Ltd.
R9-5	CP; transferable plasmid; inc F II	(7)
F-TC	TC; transferable plasmid; inc F V	This paper
RP4-1	CP TC KM; transferable plasmid; inc P	This paper
R27	TC; transferable plasmid; inc H	This paper
S-a	CP KM SM SA; transferable plasmid; inc W	This paper
N3	TC SM SA; transferable plasmid; inc N	This paper

Note. Abbreviations used; NA, nalidixic acid; Rf, rifampicin; CP, chloramphenicol; TC, tetracycline; SM, streptomycin; SA, sulfanilamide.

ヤパン), ceftazidime (CAZ, 田辺製薬), aztreonam (AZT, エーザイ), carbapenem 系薬として imipenem (IPM, 万有製薬), panipenem (PAPM, 三井) など合計 11 種を用いた。また, β -lactamase 阻害薬として clavulanic acids (CVA, スミス・クライン・ビーチャム製薬), sulbactam (ファイザー製薬), tazobactam (TAZ, 大鵬薬品) を用いた。その他抗菌薬として gentamicin (GM, シェーリング), chloramphenicol (CP, 三井), minocycline (MINO, 日本レグリー), ofloxacin (OFLX, 第一製薬) を用いた。sulfanilamide 剤 (SA), streptomycin (SM), naldixic acid (NA), rifampicin (Rf), 各種制限酵素, マーカー DNA などの必要な試薬や制限酵素は, いずれも市販品を購入して用いた。

抗菌薬感受性試験

使用菌株の各抗菌薬に対する感受性測定は, 日本化学療法学会の感受性測定法に準じて行った⁷⁾。即ち, 35°C, 一夜培養菌液を BSG (Buffered Saline with Gelatin) にて $5\sim6\times 10^6$ cfu/ml になるように希釈し, その 5 μ l をマイクロプランター (佐久間製作) にて薬剤平板に接種し, 培養した。その後, 各平板は 35°C 18~24 時間, 培養し, 各抗菌薬に対して肉眼で発育の認められない最小発育阻止濃度 (MIC) を求めた。また, imipenem などの carbapenem 薬については必要に応じて通常の 100 倍の菌数 (5×10^8 cfu/ml) を用いて MIC を求めた。

接合伝達と可動および形質転換

薬剤耐性が plasmid として存在するか否かについては常法に従って検討した⁷⁾。*S. marcescens* または形質転換によって得られた *E. coli* K 12 ML 4953 の耐性菌を供与菌, *E. coli* K 12 ML 4901 を受容菌として接合伝達を行った。形質転換は *S. marcescens* からアルカリ法により抽出した DNA を *E. coli* K 12 ML 4953 を受容菌として形質転換を行った⁷⁾。一方, 可動は, まず伝達する標準 plasmid を *E. coli* K 12 ML 4953 形質転換株を宿主として接合伝達によって共存させ, これを供与菌として *E. coli* K 12 ML 4901 を受容菌として各 plasmid の伝達を試みた。

Plasmid の型別

Plasmid はそれが同一の群に属する場合, 互いに共存することなくどちらか一方の plasmid は細胞から排除されてしまう。この現象を用いた plasmid の分類法を plasmid の型別 (不和合性, incompatibility) という。Plasmid の型別は次のようにして行った。すでに各群に分類されている標準 plasmid と調べるべき

目的の plasmid を *E. coli* K 12 株を宿主として接合伝達あるいは形質転換によって共存させ, 以下のごとく検討した¹¹⁾。まず, 各群の代表的な plasmid と調べるべき plasmid の 2 種類が共存した菌株を ST プロスにて 35°C, 一夜培養する⁷⁾。次にこの培養菌液を SD-N 培地に塗抹し, 35°C にてさらに一夜培養する。平板上に形成した菌集落をそれぞれの plasmid が担う抗菌薬耐性に相応した各抗菌薬を含む平板に画線塗抹した後, 35°C にてさらに一夜培養する。その結果, 両方の plasmid のもつ耐性が認められた場合には, 2 種の plasmid の共存が成立しており, 両者の不和合性群は異なるとし, どちらか一方の plasmid の薬剤耐性だけが検出された場合は 2 種の plasmid は互いに同一の不和合性群に属すると判定した。

β -Lactamase の調整と測定

試験菌を 10 ml の BHI プロスにて 35°C で振盪培養し, その対数増殖期後期の細胞を 4°C, 18000 $\times$ g にて 10 分間遠心, 集菌した。その菌体を 10 mM ZnCl₂ を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄し, 同緩衝液 3 ml に懸濁した。この菌液を超音波破碎し, 4°C, 18000 $\times$ g で 20 分間遠心し, その上清を粗酵素とした³⁶⁾。 β -lactamase の活性測定は, UV 法 (spectrophotometric assay, 島津 UV 2200) を用いて測定し, 各 β -lactam 薬の 100 μ M それぞれを基質として用いた。蛋白質は Bradford 法で求めた。また, 酵素活性は 30°C で 1 μ mole の基質を 1 分間に分解する酵素を 1 単位とし⁶⁾¹⁷⁾, mg 蛋白当たりの活性 (unit) で示した。

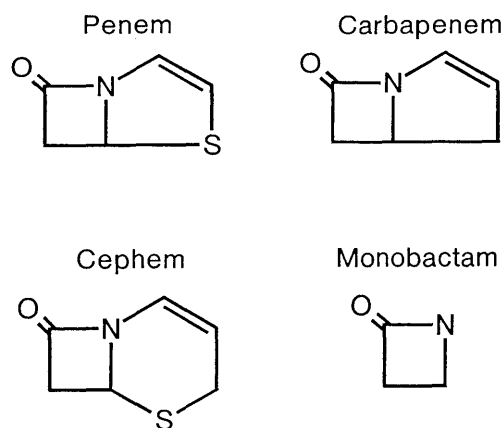
DNA の分離と制限酵素によるその切断と形質転換

染色体性 DNA および plasmid DNA の分離とその制限酵素による切断, その後行った遺伝子の cloning とその subclone 株の調整, あるいは形質転換実験など必要な実験方法はいずれも Takara のマニュアルや既報の操作に準拠した⁷⁾²⁸⁾。

結 果

薬剤感受性

Carbapenem 系薬, penicillin 系薬および cephalosporin 系薬の基本構造を Fig. 1 に示した。この carbapenem 薬である IPM の感受性分布は, 調べた 120 株中 116 株 (96.7%) の菌株が鋭い 1 峰性の感受性分布を示し, 分布から外れた菌株はわずか 4 株であった。他方, cephalosporin 系薬である CZX, CAZ, CTX や monobactam 系薬 AZT の感受性分布は, いずれも 2 ないし 3 峰性でかつ幅広い濃度範囲に分布した。こ

Fig. 1 Chemical structures of β -lactam antibioticsTable 2 Isolation frequency of drug-resistant strains of *Serratia marcescens*

Drug	Break point (mg/l)	No. of strains isolated	Isolation frequency (%)
Piperacillin	6.25	46	38.3
Cephalothin	6.25	120	100
Cefotiam	6.25	72	59.6
Cefmetazole	6.25	47	39.2
Cefoperazone	6.25	37	30.8
Cefotaxime	6.25	19	15.8
Ceftazidime	6.25	17	14.2
Aztreonam	6.25	26	21.7
Imipenem	6.25	4	3.3
Panipenem	6.25	4	3.3
Meropenem	3.13	4	3.3
Chloramphenicol	12.5	28	23.3
Gentamicin	6.25	5	4.2
Minocycline	6.25	16	13.3
Ofloxacin	6.25	40	33.3

これらの感受性分布をもとに、 β -lactam 薬に対する感受性菌と耐性菌の限界濃度を 6.25 mg/l と決めた。その結果、IPM, PAPM, MEPM 耐性菌は 120 株中 4 株 (3.3%), CAZ 17 株 (14.2%), CTX 19 株 (15.8%), CPZ 37 株 (30.8%), CMZ 47 株 (39.2%), CTM 72 株 (59.6%), CET (100%), AZT 26 株 (21.7%), PIPC 46 株 (38.3%) であった (Table 2)。さらに、今回得られた IPM, PAPM, MEPM 耐性菌 4 株中 2 株は AZT を除くいずれの β -lactam 薬、2 株は AZT を含むすべての β -lactam 薬に対してそれぞれ耐性を示した (Table 3)。

β -Lactam 薬以外の抗菌薬に対する耐性限界値を

GM (6.25 mg/l), CP (12.5 mg/l), OFLX (6.25 mg/l) および MINO (6.25 mg/l) に設定し、この薬剤濃度で増殖可能な耐性菌の分離率を求めた。その結果、GM, CP, OFLX, MINO などに対する耐性菌の分離率は、順に 4.2%, 23.3%, 33.3%, 13.3% であり、GM に対する耐性菌の割合は、IPM, PAPM などのそれとほぼ同程度であった (Table 2)。

次に、IPM, PAPM, MEPM 耐性の *S. marcescens* 4 株 (KU 971, KU 972, KU 973 および KU 974) の耐性遺伝子の解析を行った。

Carbapenem 薬耐性の遺伝解析

IPM, PAPM, MEPM 耐性を示した KU 971, KU 972, KU 973 および KU 974 各菌株の耐性遺伝子の存在様式を *E. coli* K 12 ML 4953 を受容菌として接合伝達または形質転換により検討した。その結果、IPM, PAPM, MEPM 耐性を示した *S. marcescens* 4 株から抽出した DNA を用いた場合にのみ carbapenem 薬や cephalosporin 系薬耐性と SA 耐性が同時に *E. coli* ML 4953 に形質転換された。次にここで得られた形質転換株から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動によって DNA サイズを確認したところ約 28~32 Kb の plasmid DNA が検出された。ここでこれらの plasmid を pKU 61, pKU 62, pKU 63, pKU 64 と命名した。この pKU 61, pKU 62, pKU 63, pKU 64 を用いて得られたすべての再形質転換は IPM, PAPM, MEPM に加えて、AZT を除く他の cephalosporin 系薬と SA に対して耐性、SM に対して感受性であった。このことにより、IPM, PAPM, MEPM 耐性はこれらの plasmid により支配されていることが明らかとなった。

上記の 4 株 (KU 971, KU 972, KU 973, KU 974) の β -lactam 薬に対する MIC と *E. coli* K 12 ML 4953 へ plasmid を形質転換した菌株の MIC を Table 3 に示した。*E. coli* K 12 ML 4953 の IPM, PAPM や MEPM に対する MIC は 0.025~0.10 mg/l, carbapenem 薬耐性形質転換株では 0.20~1.56 mg/l であり、各 plasmid の形質転換による耐性値の上昇はわずかであった。これに対して、CAZ などの cephalosporin 系薬に対する形質転換株の MIC は、*E. coli* K 12 ML 4953 の MIC に比べて 256 倍以上高かった。また、測定時の菌数を 100 倍に増量した 10^8 cfu/ml での IPM, PAPM, MEPM の MIC は 1.56~12.5 mg/l であったが、CAZ, CTX の MIC は >200 mg/l であった。なお、いずれの形質転換株も SA に対しては耐性、AZT, SM に対しては感受性を示した。

Table 3 Effect of inoculum size against MICs in *Serratia marcescens* and *Escherichia coli* carrying carbapenem resistant plasmid

Host	cfu per ml	MIC (mg/l)									
		CER	CMZ	CTX	CAZ	AZT	IPM	PAPM	MEPM	PIPC	SA
<i>S. marcescens</i>											
KU 971	10 ⁶	>100	>100	25	50	12.5	6.25	6.25	3.13	25	>100
	10 ⁸	>200	>200	>200	>200	100	25	25	12.5	100	>200
KU 972	10 ⁶	>100	>100	50	100	0.78	6.25	12.5	6.25	100	>100
	10 ⁸	>200	>200	>200	>200	6.25	25	50	25	>200	>200
KU 973	10 ⁶	>100	>100	100	100	25	12.5	12.5	12.5	100	>100
	10 ⁸	>200	>200	>200	>200	200	50	50	50	>200	>200
KU 974	10 ⁶	>100	>100	50	100	0.78	12.5	25	12.5	100	>100
	10 ⁸	>200	>200	>200	>200	3.13	50	50	50	>200	>200
<i>E. coli</i> K12 ML4953											
pKU 61	10 ⁶	>100	>100	12.5	50	0.05	0.78	0.78	0.39	12.5	>100
	10 ⁸	>200	>200	200	>200	1.56	3.13	3.13	1.56	25	>200
pKU 62	10 ⁶	>100	>100	50	100	0.10	0.39	0.39	0.20	6.25	>100
	10 ⁸	>200	>200	>200	>200	0.78	1.56	3.13	1.56	25	>200
pKU 63	10 ⁶	>100	>100	25	50	0.05	1.56	1.56	0.39	6.25	>100
	10 ⁸	>200	>200	>200	>200	1.56	12.5	12.5	6.25	25	>200
pKU 64	10 ⁶	>100	>100	50	100	0.78	0.78	0.78	0.78	3.13	>100
	10 ⁸	>200	>200	>200	>200	1.56	6.25	6.25	3.13	12.5	>200
—	10 ⁶	0.39	0.39	0.10	0.10	0.05	0.10	0.10	0.025	1.56	6.25
	10 ⁸	0.78	1.56	0.20	0.39	0.20	0.20	0.20	0.10	3.13	25

Carbapenem 薬耐性 plasmid の型別

今回検出した IPM, PAPM, MEPM 耐性と cephalosporin 系薬耐性がいずれも plasmid 上に存在したことから plasmid の型別を調べた。まず、標準 plasmid を供与菌、pKU 61, pKU 62, pKU 63, pKU 64 保有菌および *E. coli* ML 4901 をそれぞれ受容菌として用いた。その結果、FII, FV, Ia, H, M, N, P, W の plasmid の伝達頻度は *E. coli* K 12 ML 4901 を受容菌とした場合のそれとほぼ同じであった（データ示さず）。しかし、不和合性 H 群に属する plasmid R 27 の *E. coli* K 12 ML 4901 への伝達頻度は約 10^{-4} であったが、対象となる各種 plasmid 保有菌を受容菌とした場合の R 27 の伝達頻度は 10^{-7} 以下であった。

次に上記実験系とは逆に pKU 61, pKU 62, pKU 63, pKU 64 の各 plasmid DNA を 8 種類の標準 plasmid を保有する菌株に形質転換し、その不和合性を調べた。その結果、Table 4 に示したように、不和合性群 H に属する R 27 と共存させた場合においてのみ R 27 または pKU 61, pKU 62, pKU 63 あるいは pKU 64 のどちらか一方の薬剤耐性、即ち plasmid が高頻度に排除された。この結果から 4 種の plasmid は、R 27 と同一の不和合性 H 群に属する plasmid と結論された。

Carbapenem 薬耐性 plasmid の伝達性

S. marcescens 由来の plasmid pKU 61, pKU 62, pKU 63, pKU 64 はいずれも非伝達性であった。しかし、非伝達性 plasmid でも伝達性 plasmid との共存によって高頻度に接合伝達（可動）されることが報告されている。まず、臨床分離細菌から高頻度に分離される不和合性 FV 群の R 9-5, 次いで分離頻度の高い N 群の N 3, FII 群に属する F-(TC), P 群に属する RP 4-1 などをそれぞれ pKU 61 などの plasmid と共存させた。これを供与菌として pKU 61 などの carbapenem 耐性 plasmid の可動について調べた。その結果、pKU 61 を始めとした carbapenem 耐性 plasmid は、R 9-5 と共存させた時のみ、R 9-5 それ自身の伝達頻度 $2.1 \times 10^{-1} \sim 6.3 \times 10^{-2}$ の約 1/1000～6/1000 の頻度で可動された (Table 5)。しかし、調べたその他の plasmid による可動は認められなかった。

遺伝子の cloning

Carbapenem 剤と AZT を除く CET, CTM, CMZ, CTX, CAZ などの cephalosporin 系薬耐性が plasmid 上に位置することから、その耐性遺伝子を cloning した。制限酵素によって plasmid DNA を切断したところ、いずれのプラスミドも *Bam* H 1, *Eco* R 1,

Table 4 Incompatibility test of carbapenem resistant plasmids isolated from *S. marcescens*

Plasmids and markers tested			No. of colonies tested	Colonies resistant to determinants expressed by		
Donor	Recipient	Selection		Donor plasmid	Recipient plasmid	Both
R27 (TC) ^{a)}	pKU61 (CAZ)	TC/NA	50	44 (TC)	3 (CAZ)	3 (TC. CAZ)
R27 (TC)	pKU62 (CAZ)	TC/NA	50	29 (TC)	12 (CAZ)	9 (TC. CAZ)
R27 (TC)	pKU63 (CAZ)	TC/NA	43	28 (TC)	9 (CAZ)	6 (TC. CAZ)
R27 (TC)	pKU64 (CAZ)	TC/NA	50	42 (TC)	6 (CAZ)	2 (TC. CAZ)
pKU61 (CAZ) ^{b)} R27 (TC)		CAZ	76	68 (CAZ)	2 (TC)	6 (CAZ. TC)
pKU62 (CAZ) R27 (TC)		CAZ	100	91 (CAZ)	0	9 (CAZ. TC)
pKU63 (CAZ) R27 (TC)		CAZ	100	85 (CAZ)	4 (TC)	11 (CAZ. TC)
pKU64 (CAZ) R27 (TC)		CAZ	50	44 (CAZ)	3 (TC)	3 (CAZ. TC)

^{a)} Donor plasmids R27 were introduced into *E. coli* K12 ML4901 carrying recipient plasmid by conjugation and bacteria were grown on BTB-lactose agar plates under the selective pressure of donor and recipient markers as shown in table. Separate isolates of each combination were plated onto BTB-lactose agar plates containing the indicated antibiotics (TC, 25 mg/l; CAZ, 1.56 mg/l). These cells were next grown overnight at 37°C in ST broth without antibiotics and then were plated onto BTB-lactose agar plates containing antibiotics. Resulting colonies were picked at random and tested for the expression of the appropriate antibiotic resistant determinants, as shown in the table.

^{b)} pKU plasmids were introduced by transformation under selective pressure of antibiotics.

Table 5 Mobilization of nonconjugative carbapenem resistant plasmids by transferable plasmids

Plasmids ^{a)}	Selective markers	Frequency of transfer ^{b)}	Ratio ^{c)}
R9-5/pKU61	CP/NA	1.4×10^{-1}	1.0000
	CAZ/NA	9.0×10^{-4}	0.0064
R9-5/pKU62	CP/NA	6.3×10^{-2}	1.0000
	CAZ/NA	3.2×10^{-4}	0.0051
R9-5/pKU63	CP/NA	1.1×10^{-1}	1.0000
	CAZ/NA	1.0×10^{-4}	0.0009
R9-5/pKU64	CP/NA	2.1×10^{-1}	1.0000
	CAZ/NA	7.6×10^{-4}	0.0036
F-(TC)/pKU61	TC/NA	3.2×10^{-1}	1.0000
	CAZ/NA	$< 1.7 \times 10^{-8}$	< 0.0001
F-(TC)/pKU63	TC/NA	9.8×10^{-2}	1.0000
	CAZ/NA	$< 2.3 \times 10^{-8}$	< 0.0002
RP4-1/pKU61	KM/NA	3.1×10^{-4}	1.0000
	CAZ/NA	$< 1.9 \times 10^{-8}$	< 0.0001
RP4-1/pKU63	KM/NA	1.2×10^{-4}	1.0000
	CAZ/NA	$< 2.2 \times 10^{-8}$	< 0.0002

^{a)} Plasmids were introduced into *E. coli* K12 ML4901 strain by conjugation. For the assay of mobilization frequencies, cell cultures were grown overnight in ST broth and were diluted 1:100 into fresh ST broth. After 3 h shaking at 35°C, the donor and recipient strains were then mixed at the ratio of 1:10 and incubated at 35°C for 2 h without shaking. Cultures were then plated onto BTB-lactose agar plate containing appropriate antibiotics.

^{b)} Number of transconjugants per donor cell.

^{c)} Frequency of mobilization per conjugative plasmid.

Hind III, *Pst* I, *Sal* I などによって 4~7 ケの DNA 断片となった。次いで, vector plasmid pHSC 398 を種々の制限酵素により切断し, そこに目的の plasmid の DNA 断片を再結合させ, ML 4953 を受容菌として CET (25 μ g/ml) あるいは CAZ (1.56 mg/l) により clone 株を選択した。その結果, *Bam* H I 処理によって DNA サイズ 4.9 kb DNA 断片が pHSG 398 に結合したと考えられる 7.1 kb の組み替え株が得られた (Fig. 2)。これらの cloning 株は, いずれも AZT を除く CET, CTX, CAZ および IPM, PAPM などに対して耐性を示した。得られた形質転換株から DNA を抽出し, その制限酵素切断地図を作製した。pKU 61, pKU 62, pKU 63, pKU 64 の DNA 制限酵素切断地図はほぼ同じであった。また, pKU 61 と pKU 63 を代表として, それぞれの DNA 欠損株を製作し, carbapenem 薬耐性と SA 耐性領域を決めた。Fig. 3 に pKU 61 由来の cloning 株の DNA 制限酵素切断地図の結果を示した。

Carbapenem 薬耐性を担う plasmid 性遺伝子については, これまで *S. aeruginosa* 由来の plasmid pMS 350 が報告されている。そこから由来した cloning 株 pMS 361 の DNA 塩基配列から得られた制限酵素地図は, Fig. 4 に示したごとく pKU 61 由来のそれとほぼ同じであった (伊予部私信)。

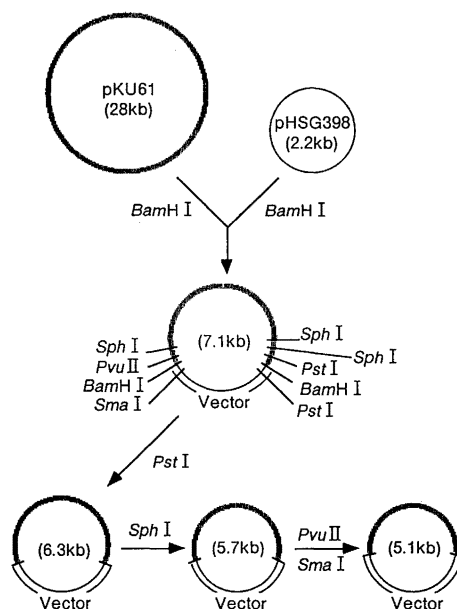


Fig. 2 Construction of the shortened plasmid pKU61 and of the recombinant plasmids using the plasmid pHSG398 as a cloning vector. DNA fragment of pKU61 is represented by the thick line. The thin line showed the vector plasmid pHSG398.

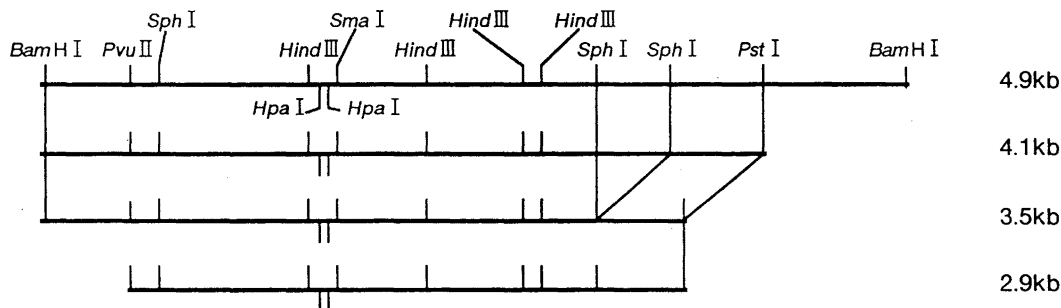


Fig. 3 Map of restriction enzyme cleavage sites of β -lactamase producing gene of pKU61

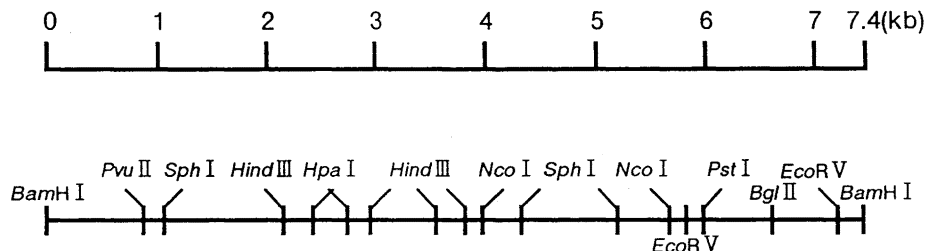


Fig. 4 Map of restriction enzyme sites of β -lactamase producing gene of pMS350

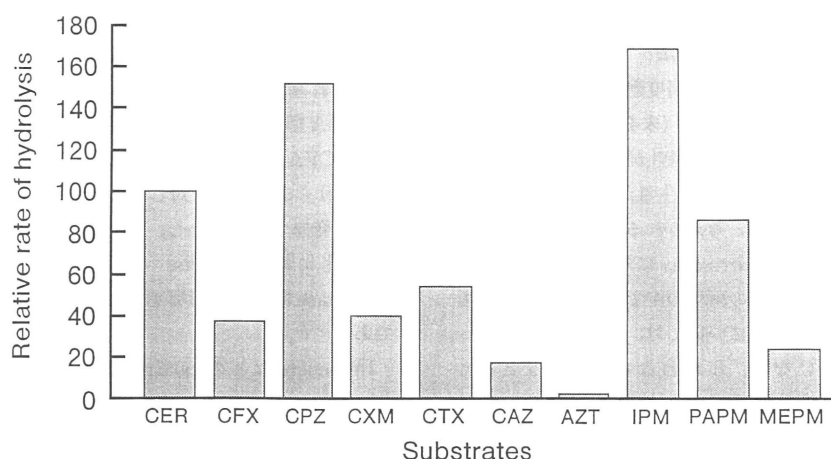


Fig. 5 Hydrolyzing activities of the enzyme from pKU61 against β -lactams. Relative rates of hydrolysis of the substrates were expressed as the per cent of hydrolysis of cephaloridine.

β -Lactamase の基質特異性の検討

今回得られた carbapenem 薬耐性 plasmid を形質転換させた *E. coli* K 12 ML 4953 から β -lactamase 粗酵素を分離し、その基質特異性を調べた。4 株由来の酵素は、CET, CFX, CTM, CAZ などの cephalosporin 系薬に加えて、IPM を始めとした carbapenem 系薬を良好な基質として、かつ高率にそれぞれの β -lactam 薬を加水分解した。しかし、AZT はまったく加水分解しなかった。とくに、いずれの酵素も ABPC に比べて CET を良好な基質として加水分解した。Fig. 5 に pKU 61 の結果を示した。この β -lactamase の基質特異性の結果は、*Tn* 支配の典型的な penicillinase (class A 型) である TEM-1 やグラム陰性桿菌由来の染色体性酵素である cephalosporinase (class C 型) のそれとは明らかに異なっていた。

次に、 β -lactamase 阻害剤および金属イオンの影響を検討した。その結果、pKU 61 由来の酵素の CVA, TAZO や SBT による阻害はわずかであった。これに対して 1 mM EDTA の添加により、その酵素活性は著しく阻害された。その他、CuSO₄, CoSO₄ 添加によっても酵素活性の低下が見られた (Table 6)。また、酵素を 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) で 2 時間透析し、その活性を調べた結果、酵素活性は透析前の 65.8% であった。これに 1 mM EDTA を添加すると酵素活性はわずか 2.4% に低下したが、これに 10 mM ZnCl₂ 添加すると酵素活性は元の活性の 35% ほどに回復した。

Table 6 Effect of inhibitors and ions on the activity of β -lactamase from *E. coli* K12 ML4953 carrying pKU61 plasmid.

Inhibitor	Per cent inhibition	
	1 mM	100 μ M
Aztreonam	12.7	6.3
Sulbactam	15.8	0
Clavulanic acid	0	30.5
Tazobactam	13.9	0
EDTA	95.2	90.0
O-phenanthroline	94.4	61.1
Iodine	1.9	1.9
HgCl ₂	90.5	91.6
CuSO ₄	85.0	58.5
ZnCl ₂	0	2.9
MgCl ₂	13.0	23.7
CoSO ₄	61.1	29.6

考 察

S. marcescens の臨床検体からの分離率は 2~3% とそれほど高くないが、しかし、分離菌の 20~30% が現在使われてる β -lactam 薬や quinolone 剤などに対して耐性を有することがわかっている³⁾³⁵⁾³⁸⁾。これは、*S. marcescens* が³⁾、*P. aeruginosa* を除くグラム陰性桿菌の中で比較的容易に class C 型 β -lactamase を誘導産生すること、誘導型 class C 型酵素産生菌から、いわゆる第三世代 cephalosporin 系薬高度耐性菌が 10^{-5} ~ 10^{-7} 頻度で選択されることによる。このようにして分離された耐性菌は、class C 型 β -lactamase を多量

に産生する場合が多い。一方, carbapenem 薬である IPM や PAPM を用いて *in vitro* で *S. marcescens* などの腸内細菌科の菌株から高度耐性菌の分離を試みたが, 耐性菌は分離されない (未発表データ)。これは, carbapenem 薬の外膜透過性が非常に良好であるため, 例え β -lactamase の産生量が増しても MIC の上昇が見られないためと考えられる。

一方, 臨床分離 *S. marcescens* に対する IPM の感受性分布は, 腸内細菌科の菌種の中ではむしろ幅広い傾向が見られる。この点については, 詳しい解析がまだとなされていない。われわれは, IPM など carbapenem 薬の感受性分布から外れた菌株は, 単に class C 型 β -lactamase の産生量の変異株でなく, むしろ外膜透過性や別の耐性機構による耐性菌と考えられた方が妥当と考えた。

今回臨床分離 *S. marcescens* の中から IPM, PAPM などの β -lactam 薬に耐性を示す耐性菌を 4 株分離し, それらの株から耐性を支配する plasmid を得ることが出来た。いずれの plasmid も 28-32 Kb DNA サイズからなり, その不和合性は H 群に型別された¹¹⁾。また, これらの plasmid は, 臨床分離細菌から最も高頻度に分離される不和合性 F II 群の plasmid によって容易に別の菌株に可動された。またデータには示さなかったが, plasmid はいずれも *P. aeruginosa* に形質転換可能であった。以上の結果は, 今後かかる宿主域の広い, 伝達性 plasmid によって容易に可動される plasmid 支配の carbapenem 薬耐性が臨床分離の種々の菌種に出現する可能性が示唆された。しかし, 今回検出した plasmid 支配の IPM や PAPM 耐性値は, *E. coli* K 12 株では 0.78~1.56 mg/l と低かった。この結果は, *P. aeruginosa* で報告されているように今回検討した *S. marcescens* も carbapenem 薬の外膜透過性が, cephem 剤に比べて遙かに優れている結果を反映しているためと考えられる²⁹⁾³³⁾。言い換えれば, carbapenem 剤はその良好な薬剤の透過性を反映し耐性の形質発現が悪いため, 腸内細菌科の菌種では carbapenem 薬耐性菌が選択されにくく, 例え出現しても生体内濃度を考えると臨床的には充分治療が可能と考えられる。しかし, carbapenemase 産生菌に外膜透過変異が加わるとその耐性値は大きく変動する可能性も考えておく必要があろう²⁵⁾。

最近, 欧米では, 抗菌スペクトルの広い cephalosporin 系薬を加水分解する extended spectrum β -lactamase (ESBL) による耐性菌の出現が報告されている¹⁶⁾²³⁻²⁴⁾³⁷⁾。これらの ESBL は class A 型 β -

lactamase の TEM-1 や SHV-1 型の構造遺伝子の DNA の塩基配列が 1 ないし数個変わることにより, それぞれ基質特異性が拡大した変異菌であり²⁴⁾³¹⁾, class A 型 β -lactamase の阻害薬である clavulanic acid (CVA) や tazobactam (TZB) によって阻害され, これらの変異菌に対して carbapenem 薬は強い抗菌力を発揮する。しかし, 今回分離した carbapenem 薬耐性に関わる class B 型酵素は, これら β -lactamase 阻害剤の影響をほとんど受けない点で問題である¹⁴⁾¹⁵⁾。

Imipenem などの carbapenem 剤はグラム陰性桿菌の PBP 2 に作用して菌を球状化する⁸⁾¹³⁾。この carbapenem 薬を加水分解する carbapenemase は, その活性保持に Zn^{++} イオンを必要とする金属イオン要求酵素であり, これらの酵素はいくつかの菌種から分離されているが³⁾¹¹⁾¹⁰⁾¹⁹⁾²²⁾²⁷⁾³⁰⁾³⁶⁾³⁸⁾。グラム陰性桿菌の染色体性遺伝子支配の IPM 加水分解酵素がいくつか報告されている¹⁰⁾¹⁹⁾²²⁾³⁸⁾。その中で腸内細菌科の菌種では, *S. marcescens* 由来の酵素としては Osano や Yang らが報告した論文のみである²²⁾²⁶⁾。しかし, Yang らの報告した *S. marcescens* 由来の酵素は, その後 TEM-1 型の一つと訂正され, Osano らの酵素は染色体性である。したがって, 現在のところ IPM 耐性を担う plasmid は, 渡辺らによって報告された *P. aeruginosa* 由来の伝達性 plasmid pMS 350 だけである³⁶⁾。しかし, pMS 350 は *E. coli* K 12 株に形質転換できないとされている³⁶⁾。そのため今回腸内細菌科の *S. marcescens* から見つけた IPM, PAPM, MEPM 耐性に関わる carbapenemase 産生遺伝子を保有する plasmid は腸内細菌科の菌種では初めての報告であり, 今後の carbapenem 薬耐性の動向を知る上でも貴重である。4 株の carbapenemase 産生遺伝子 DNA の制限酵素地図は, ほぼ同じであった。この結果は先に Osano らが報告した *S. marcescens* 染色体性遺伝子由来のそれとも類似していた²²⁾。また, IPM や PAPM などの carbapenem 薬耐性菌として *X. maltophilia* などが知られており, その染色体性遺伝子支配の酵素は carbapenemase である¹⁰⁾¹⁹⁾²²⁾³⁸⁾。Osano らの結果を参考に PCR 法により DNA の相同性を検討したが, pMS 350, pKU 61, pKU 62, pKU 63, pKU 64 DNA を template として用いた場合, いずれも DNA の増幅が認められたが, 染色耐性遺伝子支配 carbapenemase 産生菌の DNA からは DNA の増幅は出来なかった (データ示さず)。したがって, *S. marcescens* 由来の plasmid 支配の carbapenemase 産生遺伝子について

は、今後さらに詳細に検討し、その由来を明らかにする必要がある。

結 語

慢性尿路患者由来の *Serratia marcescens* 120 株から、28~32 kb の非伝達性 plasmid pKU 61, pKU 62, pKU 63, pKU 64 を分離した。この plasmid は carbapenem 剤をはじめとした β -lactam 薬耐性と sulfanilamide 耐性を担い、*Escherichia coli* K 12 株に形質転換可能であった。各 plasmid は plasmid R 9-5 との共存によって高率に可動された。この plasmid 保有 *E. coli* K 12 株の 10^6 cfu/ml の MIC は、sulfonamide > 100 mg/l, cephalothin と cefotiam は > 100 mg/l, cefotaxime と ceftazidime は 12.5~100 mg/l, aztreonam 0.05~0.78 mg/l, carbapenem 薬は 0.39~1.56 mg/l であった。また、plasmid 支配の β -lactamase は cephalosporin 系薬と carbapenem 薬を加水分解する class B 型 β -lactamase (carbapenemase) であった。この carbapenem 薬耐性遺伝子は、*Bam* H 1 によって約 4.9 Kbp の DNA 断片が cloning された。

謝 辞

今研究を行うにあたり、その指導と論文校閲に多大の尽力下さった九州大学医学部細菌学教室天児和暢教授に感謝します。また、この研究にいたる過程で種々の助言をいただいた九州大学医療短期大学澤江義郎教授ならびに北里大学医部微生物学教室井上松久教授に対してもここに御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bicknell R, Emanuel L, Gagnon J and Waley SE: The production and molecular properties of the zinc β -lactamase of *Pseudomonas maltophilia* IID 1275. *Biochem J* 229: 791-797, 1985.
- 2) Bush K: Classification of β -lactamases group 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrob Agents Chemother*. 33: 271-276, 1989.
- 3) Fujimaki K, Fujii T, Aoyama H, Sato K, Inoue Y, Inoue M and Mitsushashi S: Quinolone resistance in clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 33: 785-787, 1989.
- 4) Hueletsky A, Couture F and Levesque R C: Nucleotide sequence and phylogeny of SHV-2 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 34: 1725-1732, 1990.
- 5) Inoue M, Nonoyama M, Okamoto R and Ida T: Antimicrobial activity of aebekacin, a new aminoglycoside antibiotic, against methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 20: 233-240, 1994.

6) Inoue M, Maejima T, Sanai S, Okamoto R and Hashimoto H: Purification and properties of a chromosomal β -lactamase from *Klebsiella oxytoca*. *J. Antibiotics* 44: 435-440, 1991.

7) Inoue M, Itoho J and Mitsushashi S: pMS76, a plasmid capable of amplification by treatment with chloramphenicol. *Plasmid*. 9: 86-97, 1983.

8) 井上松久, 野々山勝人, 井田孝志, 岡本了一: カルバペネム剤の細菌学的特徴 臨床と微生物 21: 391-397, 1994.

9) Ito A, Hirai K, Inoue M, Koga H, Suzue S, Irikura T and Mitsushashi S: In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob Agents Chemother*. 17: 103-108, 1980.

10) Iaconis JP and Sanders CC: Purification and characterization of inducible β -lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 34: 44-51, 1990.

11) Jacob AE, Shapiro JA, Yamamoto L, Smith DI, Cohen SN and Berg D: Plasmid studied in *Escherichia coli* and other enteric bacteria. In *DNA Insertion Elements, Plasmid and Episomes* Ed. by Bukahari A I, Shapiro J A, Adhya S L Cold Spring Harbor. N. Y. p607-638, 1977.

12) Jacoby GE and Shapiro JA: Plasmid studied in *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas*. In *DNA Insertion Elements, Plasmid and Episomes* Ed. by Bukahari A I, Shapiro J A, Adhya S L Cold Spring Harbor. N. Y. p639-656, 1977.

13) Kesado T, Hashizume T and Asahi Y: Antimicrobial activities of new stabilized thienamycin, N-formimidoyl thienamycin, in comparison with other antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 17: 912-917, 1980.

14) Livermore D: Carbapenemase. *J Antimicrob Chemother* 29: 609-616, 1992.

15) Livermore D: Carbapenemases: The next generation of β -lactamases? *ASM News* 59: 129-135, 1993.

16) Mabilat C and Courvalin P: Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 34: 2210-2216, 1990.

17) Maejima T, Mitsushashi S and Inoue M: Cloning and expression of the genes for chromosome mediated β -lactamase production of *Proteus vulgaris* in *Escherichia coli*. *Plasmid* 18: 120-126, 1987.

18) Marber M: Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol*. 14: 385-393, 1961.

19) Nordman P, Mariotte S, Naas T, Labia R

and Nicolas MH: Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 37: 936-946, 1993.

20) Ohya S, Utsui Y, Yasuda H, Katsuta M, Fukuoka T, Magaribuchi T, Iwata M and Kuwahara S: In vitro and in vivo evaluation of CS-533. Program Abstr 30th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, abstr 895, 1990.

21) 岡本了一, 大久保豊司, 井上松久: PCR 法による MRSA の迅速診断 Modern Physician 11: 1421-1425, 1991.

22) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F and Kato N: Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother. 38: 71-78, 1994.

23) Quinn JP, Miyashiro D, Sahm D, Flamm R and Bush K.: Novel plasmid-mediated β -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 33: 1451-1456, 1989.

24) Rasmussen BA, Bradford PA, Quinn JP, Wiener J, Weinstein RA and Bush K: Genetically diverse ceftazidime resistant isolates from a single center: biochemical and genetic characterization of TEM-10 β -lactamases encoded by different nucleotide sequences. Antimicrob Agents Chemother. 37: 1989-1992, 1993.

25) Robert E, Hancock W and Woodruff WA: Roles of porin and β -lactamase in β -lactam antibiotic of *Pseudomonas aeruginosa*. Review Infect Disease 10: 770-775, 1988.

26) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491, 1988.

27) Saino Y, Kobayashi M, Inoue M and Mitsuhashi S: Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 22: 564-570, 1982.

28) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

29) Satake S, Yoshihara E and Nakae T: Diffusion of β -lactam antibiotics through liposome membranes reconstituted from purified porins of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimicrob Agents Chemother. 34: 685-690, 1990.

30) Sato K, Fujii T, Okamoto R, Inoue M and Mitsuhashi S: Biochemical properties of β -lactamase produced by *Flavobacterium odoratum*. Antimicrob Agents Chemother. 27: 612-614, 1985.

31) Sougakoff W, Goussars S and Courvalin P: The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporinase, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. FEMS Microbiol Lett 56: 343-348, 1988.

32) Sumita Y, Inoue M and Mitsuhashi S: In vitro antibacterial activity and β -lactamase stability of the new carbapenem SM-7338. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 8: 908-916, 1989.

33) Trias J and Nikaido H: Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 34: 52-57, 1990.

34) Voss A, Milatovic D, Wallrauch-schwarz C, Rosdahl V and Braveny I: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 13: 50-55, 1994.

35) Watanabe M, Kotera Y, Yosue T, Inoue M and Mitsuhashi S: In vitro emergence of quinolone resistant mutant of *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother. 34: 173-175, 1990.

36) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M and Mitsuhashi S: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 35: 147-151, 1991.

37) Weber D, Sander C, Bakken J and Quinn JP: A novel chromosomal TEM-derivative and alter outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*. J Infect Dis 162: 460-465, 1990.

38) Yang Y, Wu P and Livermore DM: Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzed penems and carbapenems from two *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother 34: 755-758, 1990.

39) 四方田幸恵, 高橋綾子, 田波 洋, 小林 功, 代居敬子, 井上松久: *Serratia marcescens* のウレアーゼ産生性と薬剤感受性について, Chemotherapy 39: 117-123, 1991.

40) 代居敬子, 熊谷幸雄, 岡田 薫, 沢江義郎: 高度耐性 *Serratia marcescens* に対する新セフェム系抗生物質と新鮮血清との殺菌効果について, Chemotherapy 38: 46-51, 1990.

41) 代居敬子, 井上松久, 橋本 一: 臨床分離の *Pseudomonas aeruginosa* の薬剤耐性. Chemotherapy, 38: 214-219, 1990.

(受付 1996-3-19)