

## 46. 2種のβラクタマーゼを有する *E.coli* の分子生物学的性質を解析

- 宇井 孝爾 奈良県立医科大学附属病院  
中山 章文 奈良県立医科大学附属病院 (現 岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科)  
藤本 育子 奈良県立医科大学附属病院

### <研究目的>

近年 Extended spectrum-β-Lactamase (ESBL) あるいは Metallo-β-Lactamase (MBL) を産生する様々なタイプのグラム陰性桿菌が国内外で増加しており、広域β-ラクタム薬への耐性化が深刻な医療問題となっている。本学附属病院にて、この両方のβラクタマーゼを産生する *Escherichia coli* が検出され、これら2種類の耐性遺伝子が Plasmid にコードされていることの確認を行い、この Plasmid の分析を行うことを目的とした。

### <材料と方法>

#### 1. 使用菌株

- ・ ESBL と MBL を産生する *E. coli* (臨床分離株 *E. coli* NM5759)
- ・ 遺伝子伝達試験の受容菌に用いた *E. coli* GN42 (アジ化ナトリウム耐性株)
- ・ 形質転換で Competent cell として用いた *E. coli* JM109 (TOYOBO)

#### 2. 菌種同定および薬剤感受性試験

各菌株の生化学的性状試験および薬剤感受性試験は、自動測定機器 VITEK 2-XL (SYSMEX bioMerieux 社) を使用し、バイテック 2 GN 同定カードとバイテック 2 グラム陰性菌感受性カード AST-N125 を用いて添付文書に従い実施した。

#### 3. ESBL および MBL 確認試験

試験菌株および遺伝子伝達菌株の ESBL および MBL 産生性の確認試験は、Double Disk synergy test (DDST) によって行った。

#### 4. 遺伝子伝達試験

受容菌 (*E. coli* GN42) および供与菌 (*E. coli* NM5759) を混合培養した。発育したコロニーを 25μg/mL ABPC と 1mM アジ化ナトリウムを含む Luria-Bertani (LB) 寒天培地で培養した。発育したコロニーについて生化学的性状および薬剤感受性の確認を行った。なお、試験前の受容菌、供与菌をそれぞれ LB 寒天培地 (ABPC, アジ化ナトリウムを含む) にて同条件で培養し、発育しないことを確認した。

#### 5. プラスミド DNA の調整

プラスミド精製キット NucleoBondBAC100 (MACHEREY-NAGEL 社) を用いて添付の説明書に従い、プラスミド DNA の調整を行った。プラスミドの確認は 0.7%アガロースゲルにて電気泳動 (100V, 45分) し、GelRed (Nucleic Acid Gel Stain, 10,000x in Water, Biotium) で 20分染

色後、トランスイルミネーターで確認した。

## 6. 形質転換実験

*E. coli* NM5759 より精製したプラスミド DNA を、*E. coli* Competent Cell Kit (Competent high JM109, TOYOBO) に対して形質転換実験を行った。

## 7. PCR 法による ESBL, MBL 産生遺伝子の確認

特異プライマーを用いた PCR 法による薬剤耐性遺伝子 *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub> の検出を行った。PCR 反応液の組成は 5×Green buffer ; 5μL, 25mM MgCl<sub>2</sub> ; 2.5μL, 10mM dNTPs ; 0.5μL, 10μM CTX-M-F1(IMP1-F1) ; 1μL, 10μM CTX-M-R1(IMP1-R1) ; 1μL, 5units/μL GoTaq PCR polymerase ; 0.25μL, 滅菌 H<sub>2</sub>O 12.25μL, 鋳型 DNA 2.5μL で全量が 25μL になるように調整した。PCR の反応条件は 94°C, 2 分のプレサイクル後, 94°C 30 秒, 58°C 60 秒, 72°C 60 秒を 35 サイクル行ない, 最後に 72°C で 3 分間反応させた。増幅産物は 2%アガロースゲル (Invitrogen Ultrapure agarose 1200mg in 60mL 1×TAE buffer + 6μL SYBR SAFE DNA stain, ×10000) で電気泳動を行い確認した。

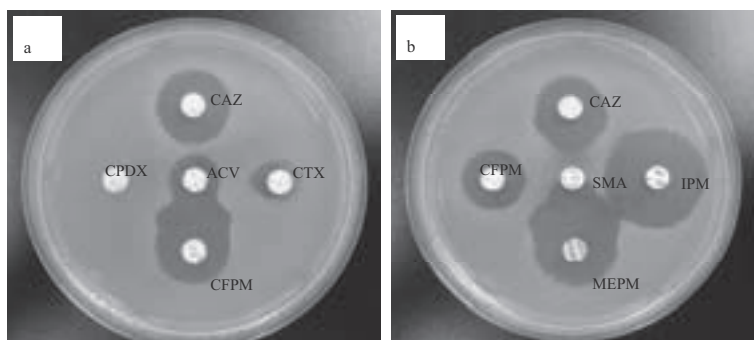
## 8. 塩基配列の解析

プラスミド p-NM5759-JM の塩基配列の解析には, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub> の検出に使用した PCR プライマーを用いて, ESBL および MBL 遺伝子を起点として塩基配列を調べた。塩基配列の解析は, Sanger ら<sup>1)</sup>の方法に従いシーケンス反応には BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit を使用し, ABI prism 310 genetic analyzer ( Applied Biosystems)によって分析した。また, 得られた塩基配列の解析は, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて行った。

## <結果>

### 1. *E. coli* NM5759 の ESBL および MBL 産生性確認試験

*E. coli* NM5759 は ESBL および MBL を同時に産生していることが確認された。



Double Disk synergy test (DDST) (a) Extended spectrum-β-lactamase (b) Metallo-β-lactamase

### 2. 遺伝子伝達試験

供与菌株 (*E. coli* NM5759), 受容菌株 (*E. coli* GN42), 遺伝子伝達菌株 (*E. coli* NM5759/GN42) の生化学的性状 (表 1) および, 薬剤感受性パターン (表 2) を比較した。生化学的性状は *E. coli* GN42 と *E. coli* NM5759/GN42 において完全に一致し, 薬剤感受性パターンは殆どの β-ラクタム系薬において *E. coli* GN42 に比して, *E. coli* NM5759/GN42 は MIC 上昇を認めた。

表 1. 生化学的性状の比較

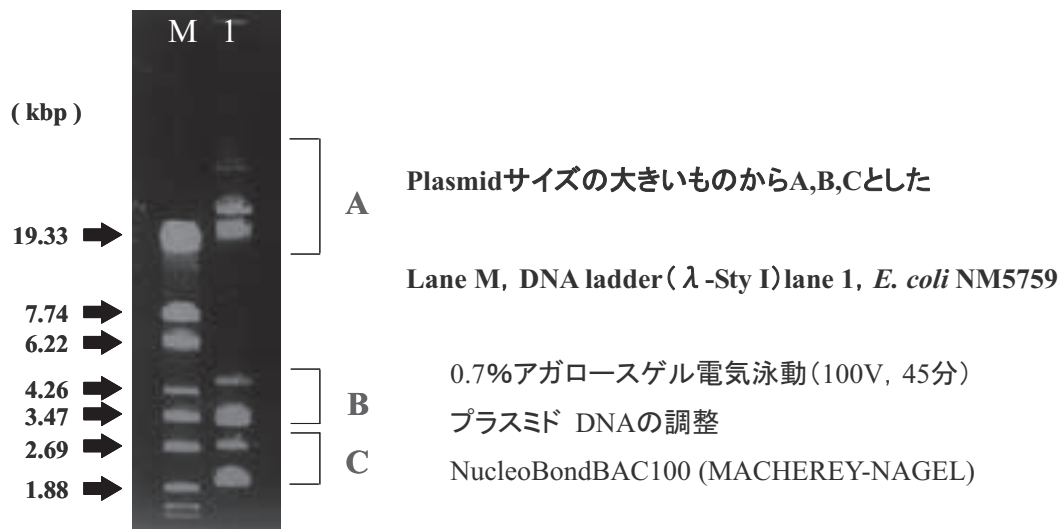
	<i>E. coli</i> NM5759 (donor)	<i>E. coli</i> GN42 (recipient)	<i>E. coli</i> NM5759/GN42 (transconjugant)	
BGAL	+	-	-	BGAL; Beta-galactosidase
ProA	-	+	+	ProA; L-Proline arylamidase
TyrA	-	+	+	TyrA; Tyrosine arylamidase
SAC	+	-	-	SAC; saccharose/sucrose
5KG	-	+	+	5KG; 5-Keto-D-gluconate
PHOS	-	+	+	PHOS; phosphatase
ODC	+	-	-	ODC; Ornithine Decarboxylase
BGUR	+	-	-	BGUR; Beta-gluconidase
O129R	-	+	+	O129R; O/129 Resistance
ELLM	-	+	+	ELLM; Ellman
MOT	+	-	-	

表 2. 薬剤感受性パターンの比較

	MIC ( $\mu$ g/mL)		
	<i>E. coli</i> NM5759 (donor)	<i>E. coli</i> GN42 (recipient)	<i>E. coli</i> NM5759/GN42 (transconjugant)
Ampicillin	$\geq 32$	$\leq 2$	$\geq 32$
Piperacillin	$\geq 128$	$\leq 4$	$\geq 128$
Amoxicillin/ clavulanate	$\geq 32$	4	16
Cefazolin	$\geq 64$	$\leq 4$	$\geq 64$
Cefmetazole	$\geq 64$	$\leq 1$	32
Cefpodoxime	$\geq 8$	$\leq 0.25$	$\geq 8$
Cefotaxime	$\geq 64$	$\leq 1$	$\geq 64$
Ceftazidime	16	$\leq 1$	16
Aztreonam	$\geq 64$	$\leq 1$	16
Cefepim	4	$\leq 1$	2
Imipenem	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$
Meropenem	1	$\leq 0.25$	2
Gentamicin	4	$\leq 1$	$\leq 1$
Levofloxacin	$\geq 8$	$\leq 0.12$	$\leq 0.12$
Ciprofloxacin	$\geq 4$	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$

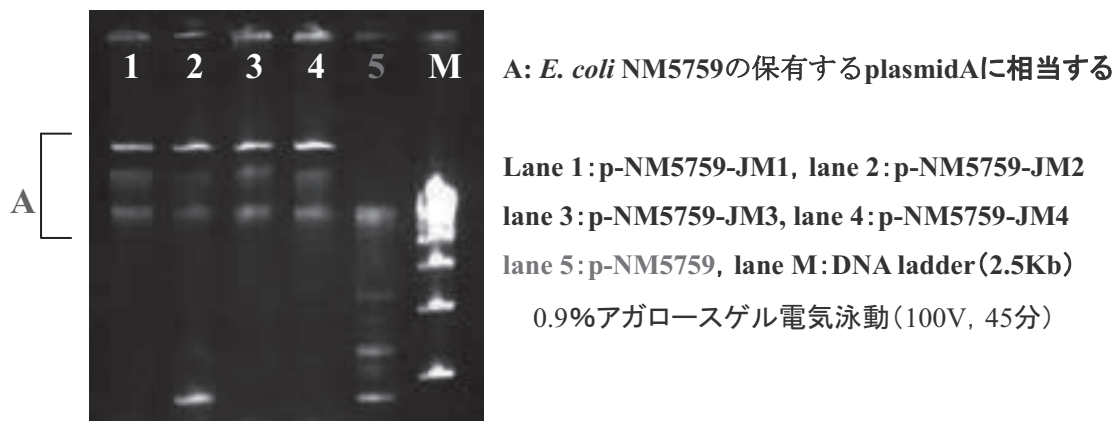
### 3. *E. coli* NM5759 のプラスミドパターン

サイズの異なる 3 種類のプラスミドに相当すると考えられる DNA バンドが確認された。



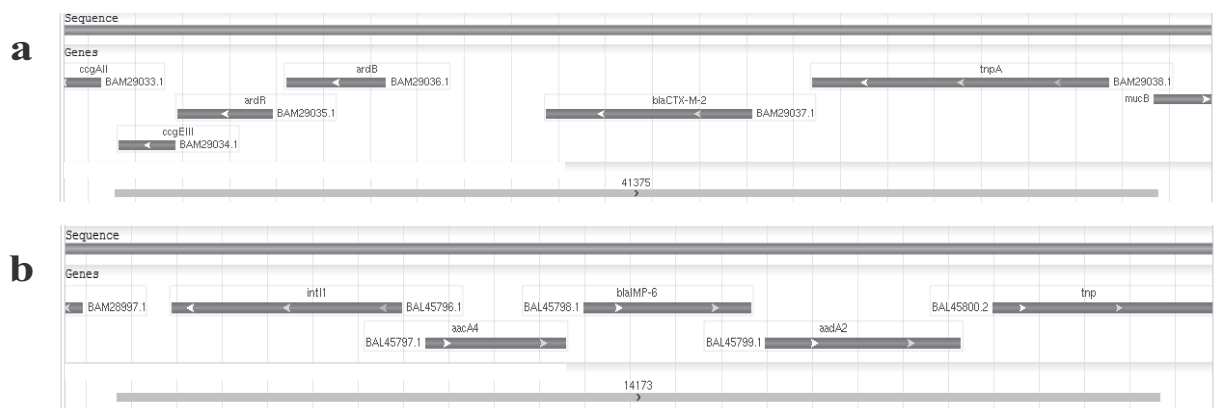
#### 4. ESBL および MBL 遺伝子を保有するプラスミド DNA の単離

最もサイズの大きい p-NM5759-JM のみを保有し、ESBL および MBL 遺伝子の PCR が陽性を示す形質転換株が得られた。



#### 5. プラスミド p-NM5759-JM の分析

ESBL 遺伝子を起点とした配列では *bla*<sub>CTX-M-2</sub> の構造遺伝子とその上流に *ccgAII*, *ccgEIII*, *ardR*, *ardB*, 下流に *tnpA* の塩基配列が確認された (下図-a). そして, *bla*<sub>IMP-6</sub> を起点とした配列では MBL 産生遺伝子の構造遺伝子とその上流に *intI1*, *aacA4*, 下流に *aadA2*, *tnp* の塩基配列が確認された (下図-b).



*ccgAII*; CcgAII regulatory protein, *ccgEIII*; CcgEII regulatory protein, *ardR*; ArdR regulatory protein, *ardB*; ArdB antirestriction protein, *tnpA*; ISEcp1B transposase, *intI1*; Class I integrase, *aacA4*; aminoglycoside (6)-N-acetyltransferase, *aadA2*; aminoglycoside adenyltransferase, *tnp*; Transposase of IS91 family

<考察>

2012年に Shigemoto ら<sup>2)</sup>が *K. pneumoniae* において *bla*<sub>CTX-M-2</sub> と *bla*<sub>IMP-6</sub> をコードするプラスミド pKPI-6 を報告している。今回 *E. coli* NM5759 から単離した p-NM5759-JM の *bla*<sub>CTX-M-2</sub> と *bla*<sub>IMP-6</sub> 周囲の塩基配列は pKPI-6 との相同性が高く (*bla*<sub>CTX-M-2</sub> 周辺 4505bp⇒相同性 98%, *bla*<sub>IMP-6</sub> 周辺 4594bp⇒相同性 90%) pKPI-6 と同一のプラスミドの可能性が示唆された。また, Yano ら<sup>3)</sup>は, PCR 法にて IMP-1 遺伝子陽性であった *E. coli* 54 株のうち, 増幅産物の塩基配列を調べたところ, 49 株が IMP-6 タイプであり, IMP-6 遺伝子を保有する株のすべてが CTX-M 遺伝子陽性であったと報告していることから, CTX-M と IMP-6 の遺伝子をコードする同様のプラスミドが, 種属を超えて市中に拡散している可能性が危惧される。

<まとめ>

今回我々は, ESBL および MBL を同時に産生する *E. coli* NM5759 について, 耐性遺伝子の存在部位および遺伝的な性質について調べた。*E. coli* NM5759 は少なくとも3種類のサイズの異なるプラスミドを保有しており, 最もサイズの大きい p-NM5759-JM に両方の耐性遺伝子が存在していた。

<参考文献>

- 1) Sanger,F., Nicklen,S.,and Coulson,A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.Proc. Natl.Acad. Sci. USA.74:5463–5467,1977.
- 2) Shigemoto,N.,Kuwahara,R.,Kayama,S.,Shimizu,W.,Onodera,M.,Yokozaki,M.,Hisatsune,J.,Kato,F.,Ohge,H. and Sugai,M.:Emergence in Japan of an imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*<sub>IMP-6</sub>. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 72 :109–112,2012.
- 3) Yano,H.,Ogawa,M.,Endo,S.,Kakuta,R.,Kanamori,H.,Inomata,S.,Ishibashi,N.,Aoyagi,T.,Hatta,M.,Gu,Y.,Yamada,M.,Tokuda,K.,Kunishima,H.,Kitagawa,M.,Hirakata,Y. and Kaku,M.: High frequency of IMP-6 among clinical isolates of metallo-β-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.56:4554-4555, 2012.

<経費使用明細>

遺伝子解析情報処理ソフトウェア GENETYX Ver. 11	285,000 円
事務管理手数料	15,000 円
合計	300,000 円

以上