

[総 説]

広域 β -ラクタム薬耐性に関する β -ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関

荒川宜親

国立感染症研究所細菌第二部

(平成15年10月28日受付)

内外の医療現場では、セフトジジムなどのオキシミノセファロスポリン（いわゆる第三世代セファロスポリン）を分解するTEM-、SHV-由来の基質スペクトル拡張型 β -ラクタマーゼ（ESBLs）やセフトキシム、セフトリアキソンを効率良く分解するCTX-M-型 β -ラクタマーゼ、さらに、セフミノクスやラタモキセフを分解するCMY-型 β -ラクタマーゼなどを産生するグラム陰性桿菌が出現・増加し、医療現場で問題となっている。一方では、IMP-型やVIM-型などのメタロ- β -ラクタマーゼを産生するカルバペネム耐性の腸内細菌科の細菌やブドウ糖非発酵菌群もほぼ地球上の全ての地域から報告されるようになり、広域 β -ラクタム薬による化学療法に支障をきたす事例が発生している。その他にも、種々の新規の β -ラクタマーゼを産生する株が出現しており、それらの状況は非常に複雑かつ渾沌とした状況になりつつあるため、それらを遺伝学的な視点から整理し、各々の特徴について紹介する。

Key words: β -ラクタマーゼ, セファロスポリナーゼ, セファマイシナーゼ, カルバペネマーゼ, 遺伝子型別, 分子分類, 機能分類

1. はじめに

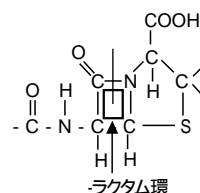
1980年代の中頃から、海外や国内の医療施設で、セフトキシム（CTX）やセフトジジム（CAZ）などのオキシミノセファロスポリン（いわゆる第三世代セファロスポリン）やラタモキセフ（LMOX）やセフミノクス（CMNX）などのセファマイシン、さらにイミペネム（IPM）などのカルバペネムに耐性を獲得した肺炎桿菌、大腸菌、セラチア、緑膿菌などのグラム陰性桿菌が出現し、20年が経過しようとしている。現在、内外の臨床現場では、第三世代セファロスポリンを分解する基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ（Extended-Spectrum β -Lactamase = ESBL）¹⁾を産生する株のみならず、セファマイシンを分解するCMY-型 β -ラクタマーゼ²⁾、さらに、カルバペネムを分解するメタロ- β -ラクタマーゼ³⁾などを産生する

様々なグラム陰性桿菌が増加しつつあり、感染症の化学療法に様々な現実的困難を及ぼしつつある。

本稿では、これらの β -ラクタマーゼの特徴やそれらの遺伝的相関について解説する。

 β -ラクタマーゼの種類と分類法

β -ラクタマーゼは、ペプチド結合（-CO-NH-）を切断する酵素であり、広い意味でペプチダーゼ（プロアーゼ）の仲間と見なすことができる。ペプチダーゼに

 β -ラクタマーゼserine- β -lactamasemetallo- β -lactamase

プロアーゼ（ペプチダーゼ）

serine-protease

metallo-protease

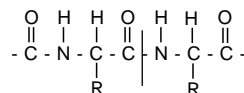


図 1

著者連絡先: (〒208-0011) 武蔵村山市学園4-7-1

国立感染症研究所細菌第二部

荒川宜親

TEL 042-561-0771

FAX 042-561-7173

E-mail: yarakawa@nih.go.jp

表 1 主な β -ラクタマーゼの機能分類と分子分類の対照表

		機 能 分 類									
		ペニシラーゼ		セファロスポリナーゼ		セファマイシナーゼ		オキサシリンナーゼ		カルバペネマーゼ	
		染色体性	プラスミド性	染色体性	プラスミド性	染色体性	プラスミド性	染色体性	プラスミド性	染色体性	プラスミド性
分 子 分 類	A	LEN-1	PC-1 TEM-1 SHV-1	KOXY, KI, RbiA CepA	TEM-91 SHV-12 SHV-24 CTX-M-2 GES-1		GES-4			Sme-1	NMC-A IMI-1 KPC-1 GES-2 (GES-4)
	C	PenA (<i>Burk. cepacia</i>)		AmpC	DHA-1		MIR-1,MOX-1 FOX-2 CMY-1 CMY-9				
	D	AmpS (<i>Aero. sobria</i>)							OXA-1, OXA-2		OXA-23 OXA-24
	B			β -lactamase (<i>B. cereus</i>)							L-1 BlaB GOB-1 IND-1 CfiA(CcrA) CphA-1

は、セリン型とメタロ型が知られているが、 β -ラクタマーゼにもセリン型とメタロ型が存在し、前者はクラス A, C, D の 3 グループ、後者はクラス B に分類される (図 1, 表 1)。また、機能的には、細菌の細胞壁の主成分の一つであるペプチドグリカンの生合成に関与するペプチドグリカン合成酵素群 (ペニシリンなどの β -ラクタム薬の標的分子であり、ペニシリンが結合するため、ペニシリン結合タンパク質 = PBP と呼ばれている) のトランスペプチダーゼ領域と構造的に共通したアミノ酸配列を保持しており、それらと遺伝的に関連の深い酵素と考えられている (図 2) が、その本来の機能については不明な点が多い。

β -ラクタマーゼを分類する場合、その酵素活性や基質特異性に基づく機能分類法とアミノ酸配列の比較を基準とした分子分類法がある。遺伝子や分子の構造を解析するのが困難であった 1980 年代までは、主に Richmond と Sykes により提唱された機能分類法⁴⁾などが用いられていたが、基質特異性を頼りとする機能分類法では、 β -ラクタマーゼの本質的分類が困難であったため、その後、Ambler による遺伝子や分子の構

表 2 広域 β -ラクタム薬を分解する主な β -ラクタマーゼ

β -ラクタマーゼ	Bushらの機能分類(1995)	Amblerの分子分類
TEM-1, TEM-2, SHV-1	2b	A
TEM-, SHV-由来 ESBLs	2be	A
CTX-M-型 β -ラクタマーゼ	2be	A
<i>K. oxytoca</i> K1, KOXY, RbiA	2be	A
NMC-A, Sme-1	2f	A
PSE-1, PSE-3, PSE-4	2c	A
AmpC, MIR-1, CMY-型 β -ラクタマーゼ	1	C
L-1, IMP-1, VIM-1,...	3	B
OXA-型 β -ラクタマーゼ	2d	D

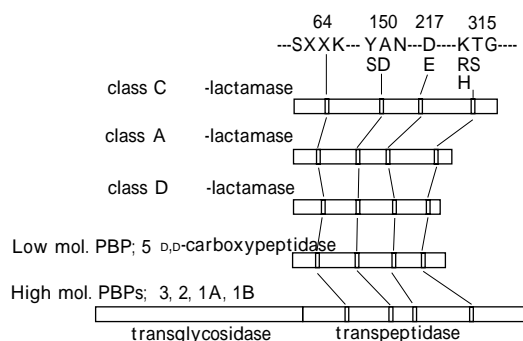


図 2 セリン型 β -lactamase と PBP の構造的関係

表4 主なプラスミド性のβ-ラクタマーゼの出現(または報告年)の経過

1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
PSE-1, PSE-3 carbenicillinase																					
OXA-1などのoxacillinase																					
TEM-, SHV-由来ESBL																					
MEN-1, CTX-M型 β-ラクタマーゼ																					
IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ																					
MIR-1, MOX-1, CMY-型 β-ラクタマーゼ																					
FOX型 β-ラクタマーゼ(クラスC)																					
DHA型 β-ラクタマーゼ (クラスC)																					
VIM型																					
メタロβ-ラクタマーゼ																					
OXA-23以降の カルバペネマーゼ																					
GES型 β-ラクタマーゼ																					

造解析に基づいた分子分類法⁵⁾が主流となってきた。表1に主なβ-ラクタマーゼの機能分類と分子分類の関連を示す。表2には1995年にBushらにより提唱された機能分類⁶⁾の概要を示す。しかし、それ以後、VIM-型やGES-型、OXA-23以降のカルバペネマーゼなどが新しく発見されており、表の追加修正が必要になっている。

国内外におけるβ-ラクタマーゼの出現の概歴
ペニシリンを分解するペニシリナーゼが黄色ブドウ球菌で発見されたのは既に50年程前のことになる。その後、大きな転換点となったのは、1980年代にフランスなどから報告されはじめた、第三世代セファロスポリンを分解する基質スペクトル拡張型β-ラクタマーゼ Extended-Spectrum β-Lactamase, 略してESBL)の出現⁷⁾であった。ESBLの遺伝子は通常、伝達性の巨大プラスミドにより媒介されているため、肺炎桿菌や大腸菌等の腸内細菌科の菌群に容易に水平に伝播することが可能であり、その事実は、この種の耐性菌のその後の世界的規模での増加・蔓延を予期していた。

一方、その当時、*Enterobacter*属や*Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*などでは、染色体性のAmpC型セファロスポリナーゼの遺伝子(*ampC*)の発現が、そのプロモーターや調節遺伝子(*ampR*)などの変異など、様々なメカニズムにより亢進することによる、セファロスポリン耐性株が知られていた⁸⁾。しかし、それらはCAZやCTXなどに耐性を獲得する

までには至っていなかった。しかし、1990年には、プラスミド依存性にCAZに耐性を獲得した*Klebsiella pneumoniae*よりMIR-1と命名された新たなβ-ラクタマーゼが報告された⁹⁾。同じころ筆者らは、国内の医療施設で、当時耐性菌が出現し難いとされていたラタモキシム(LMOX)に耐性を獲得した*K. pneumoniae*を泌尿器科の患者尿から分離した。そしてこの株が、LMOXとともにCAZやCTXなどをも分解する新しいクラスC型β-ラクタマーゼ(MOX-1と命名)を産生していることを発見し報告した¹⁰⁾。また、最近では、セファマイシン耐性*E. coli*よりCMY-9と命名した新規のプラスミド性のセファマイシナーゼを発見し報告した¹¹⁾。

他方、1980年代の後半に富山県の病院で、伝達性のカルバペネム耐性が緑膿菌で報告された¹²⁾。当時の常識では、この種の耐性菌の存在は「異例」と考えられていた。筆者らは、1991年に愛知県内の病院で分離されたイミペネム耐性の*Serratia marcescens* TN9106株を分離し、この耐性株から新規のメタロβ-ラクタマーゼ(IMP-1)を発見し報告した¹³⁾。後に、富山県で最初に分離されたカルバペネム耐性緑膿菌もこれと同じIMP-1を産生していることが明らかとなった¹⁴⁾。TN9106株のメタロβ-ラクタマーゼの遺伝子(*bla_{IMP}*)は、当時でははっきりしなかったが、その後、染色体状のクラス1のインテグロン構造により媒介されていることが判明し、富山県で分離された緑膿菌の*bla_{IMP}*も同様にプラスミド上のクラス1のインテ

グロン構造により担われていることが明らかとなった¹⁵⁾。それと相前後して、筆者らは愛知県内の別の病院でカルバペナム耐性を獲得した *S. marcescens* を数株分離したが、それらにおいてはIMP-1が伝達性のプラスミドに依存して産生されており¹⁶⁾、しかも、新規のインテグロンにより媒介されていることを明らかとした¹⁷⁾。後に、この新規のインテグロンは、インテグロンの発見者であるHallらにより、クラス3のインテグロンとして新たに認定された¹⁸⁾。

さらに海外では、1990年に入るとCAZやCTXなどに、耐性を獲得した *E. coli* や *K. pneumoniae* が医療現場で増加し問題となっていたが、それらは、主にTEM-1やSHV-1に由来するESBLであった¹⁹⁾。しかし、国内では現時点でも、この種のTEM-、SHV-由来ESBLの分離報告は未だ稀であり、それにかわってCTXやCTRを効率良く分解可能なCTX-M型 β-ラクタマーゼを産生する株が、各地から分離されている²⁰⁾。表4に主な β-ラクタマーゼが発見されてきた歴史的経過を示す。

広域 β-ラクタム薬を分解する β-ラクタマーゼの種類と特徴

クラスAに分類される β-ラクタマーゼの中で、オキシミノ β-ラクタム薬 (= 第三世代セファロsporin) やセファマイシン、カルバペナムを分解するものとして、ESBL、CTX-M型 β-ラクタマーゼ、GES型 β-ラクタマーゼ、Sme-1、NMC-A型など各種の β-ラクタマーゼが知られている。クラスA型 β-ラクタマーゼは通常、クラバン酸などの β-ラクタマーゼ阻害剤により阻害される。一方、クラスCに分類される β-ラクタマーゼとしては、変異型 AmpC型 β-ラクタマーゼ、CMY型 β-ラクタマーゼ (セファマイシナーゼ)、さらにクラスBに分類される β-ラクタマーゼとしては、IMP-1型メタロ β-ラクタマーゼなどが知られている。クラスCやクラスBの β-ラクタマーゼは β-ラクタマーゼ阻害剤の影響を受けにくく、その点がクラスAとの鑑別点になるが、例外も少なからず存在する。一方、オキサリナーゼを原型とするプラスミド依存性のOXA型 β-ラクタマーゼも多数報告されており、OXA-23、OXA-24などは、カルバペナムを分解するという特徴を持っている。図3に、主な β-ラクタマーゼの遺伝的相関を示し、以下、各々の特徴などについて紹介する。

1. クラスA β-ラクタマーゼ

1) TEM-、SHV-由来ESBL

TEM-、SHV-由来ESBLは、そのプロトタイプであるTEM-1やTEM-2、SHV-1などのペニシリナーゼの

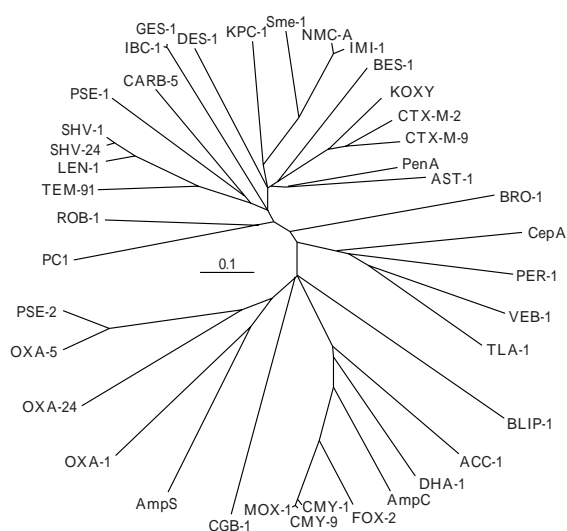


図3 主なセリン型 β-ラクタマーゼの遺伝的相関

遺伝子に数カ所の変異が起こり、1~数カ所のアミノ酸残基の置換が発生することにより、CAZやCTXなどの第三世代セファロsporinを分解することが可能となった一群の β-ラクタマーゼである (図4a, b)。特にSHV型 β-ラクタマーゼは、*K. pneumoniae* の染色体性の β-ラクタマーゼ²¹⁾と遺伝的に極めて近縁の関係にあり²²⁾、この事実は、*K. pneumoniae* に対しPCRを行う場合、SHV型 β-ラクタマーゼのプライマーを用いると、偽陽性となることが多く混乱の原因となることに留意する必要がある。またこれらは、クラバン酸により強く阻害を受けることが特徴である。しかし、*K. pneumoniae* などでは、染色体性のLEN-1型 β-ラクタマーゼやSHV-1型ペニシリナーゼの過剰産生に加え、膜の変化が重なるとCAZのMIC値が32 μg/ml程度となる株が出現することがあり、ESBL産生菌と紛らわしい場合があるので、注意が必要である。

2) CTX-M型 β-ラクタマーゼ

CTX-M型 β-ラクタマーゼは、我が国では最初にToho-1型 β-ラクタマーゼとして発見された²³⁾。この種の酵素はCTXやCTRを効率良く分解するが、CAZは殆ど分解できないのが特徴である。そしてその遺伝子は、TEM-、SHV-由来ESBLの遺伝子と同様に、伝達性の巨大プラスミドにより媒介されている。TEM-、SHV-由来ESBLと比べ、スルバクタムにより阻害されにくいという性質を示し、その点が鑑別点として用いられる。またCTX-M型 β-ラクタマーゼは、遺伝的には、*Klebsiella oxytoca*²⁴⁾や *Kluyvera*

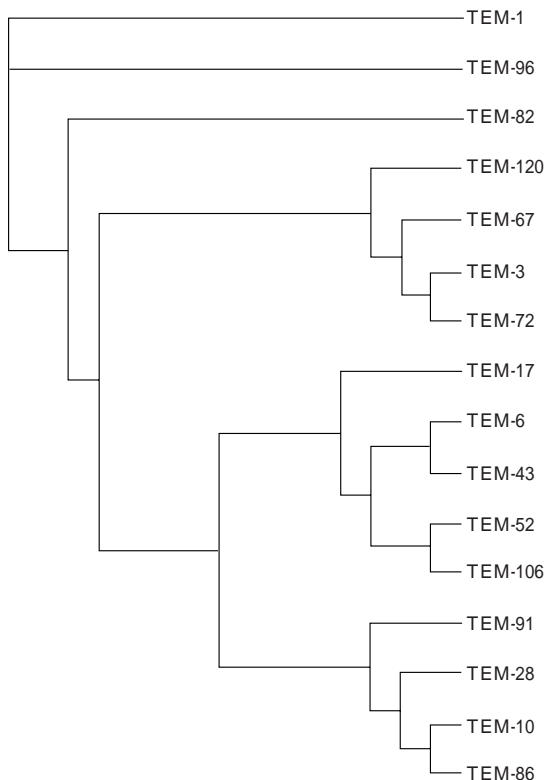


図 4 a TEM-型 β-ラクタマーゼの相関

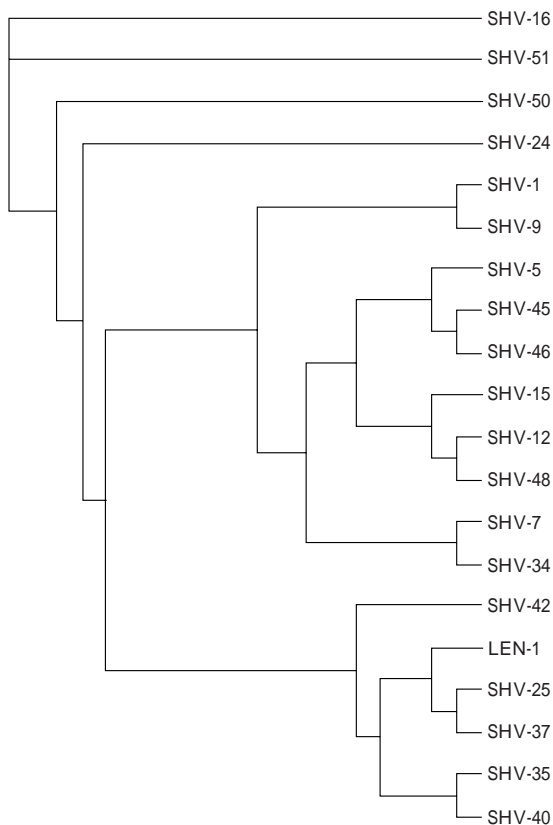


図 4 b SHV-型 β-ラクタマーゼの遺伝的相関

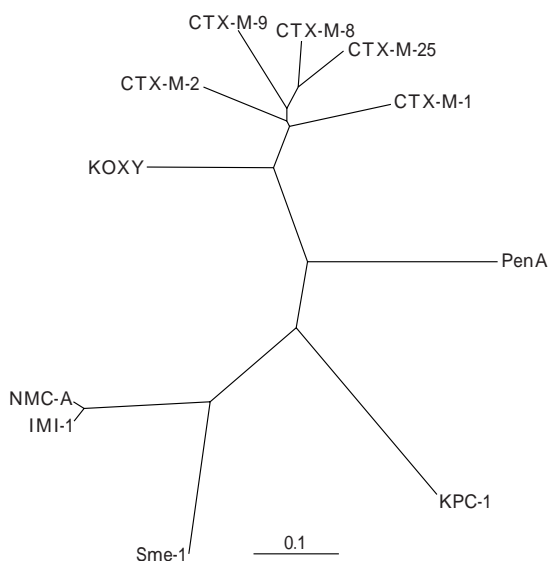


図 5 CTX-M-型 β-ラクタマーゼとその近縁の酵素との遺伝的相関

georgiana の染色体性 β-ラクタマーゼに近縁の関係にあり (図 5), おそらくは, それらの近縁の細菌の染色体性の β-ラクタマーゼ遺伝子がプラスミド上に転位して出現したものと推定されている²⁵⁾。また, 国内の屠畜場における牛の調査から, CTX-M-2 型 β-ラクタマーゼを産生する株が 2% 程度の頻度で分離されることが明らかとなっており²⁶⁾, このタイプの β-ラクタマーゼの由来を考える場合, 示唆を与えるものとなっている。CTX-M-型 β-ラクタマーゼは, 遺伝的に CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 のグループに分けられ (図 6, 図 7a, b, c, 表 3), 各々のグループ間には, PCR により概観識別可能である。国内では, CTX-M-2 (Toho-1) や CTX-M-3, さらに CTX-M-9 産生株が多く分離される傾向が見られるが, これらの CTX-M-型 β-ラクタマーゼをいわゆる「ESBL」に含めるか否かについては, 論議がある。その理由としては, CTX-M-型 β-ラクタマーゼは発見された時点で, 既に CTX やセフトリアキソン (CTR) などを効率良く分解する能力を有し

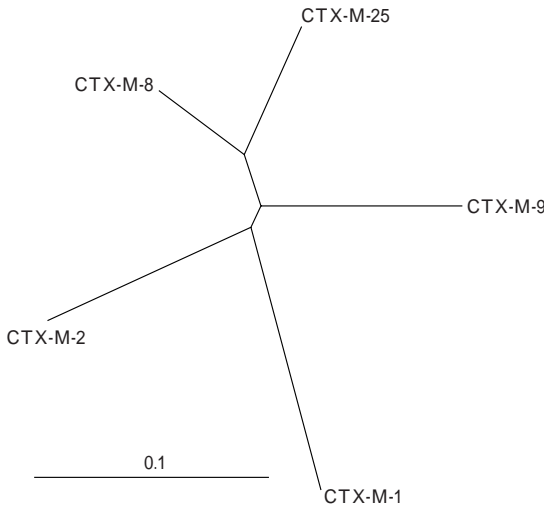


図6 CTX-M型 β -ラクタマーゼの5つのサブグループ

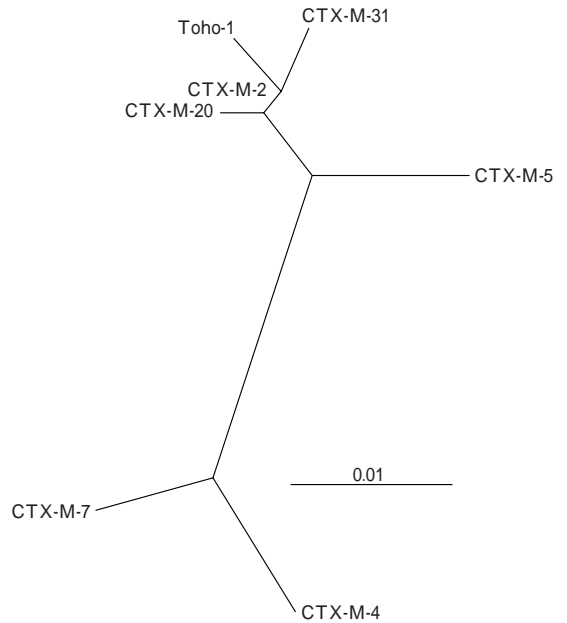


図7b CTX-M-2のサブグループの遺伝的相関

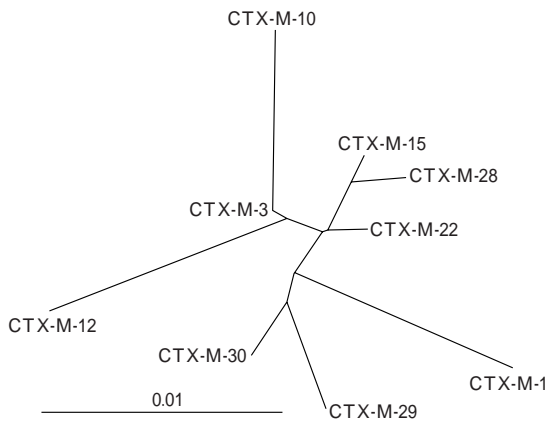


図7a CTX-M-1のサブグループの遺伝的相関

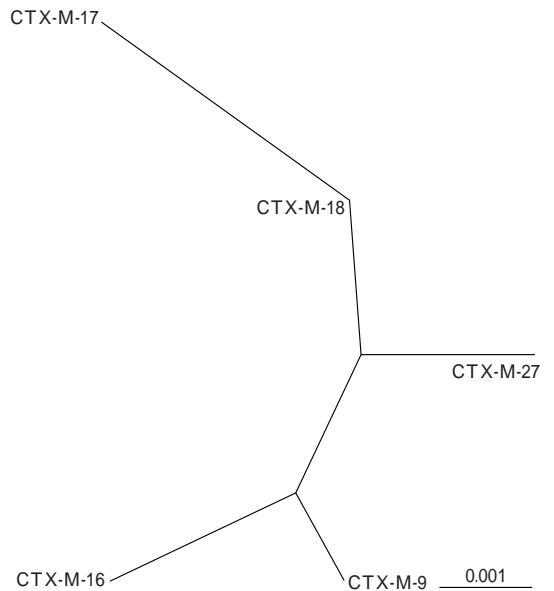


図7c CTX-M-9のサブグループの遺伝的相関

ており、しかも、そのプロトタイプに相当する「ペニシリナーゼ」のような原型酵素が発見されていないということである。また、*in vitro*ではCTX-M型 β -ラクタマーゼは、CAZなどの他のオキシミノ β -ラクタム薬を殆ど分解できないなどの特徴がある。したがって、NCCLSがESBL産生菌の検出時には「全てのセファロスポリンに耐性」と報告することを推奨している現状では、CAZを殆ど分解できず、菌にCAZ耐性を付与し難いCTX-M型 β -ラクタマーゼを、単純に「ESBL」に含めて良いか否か、臨床的な検証が必要となっている。

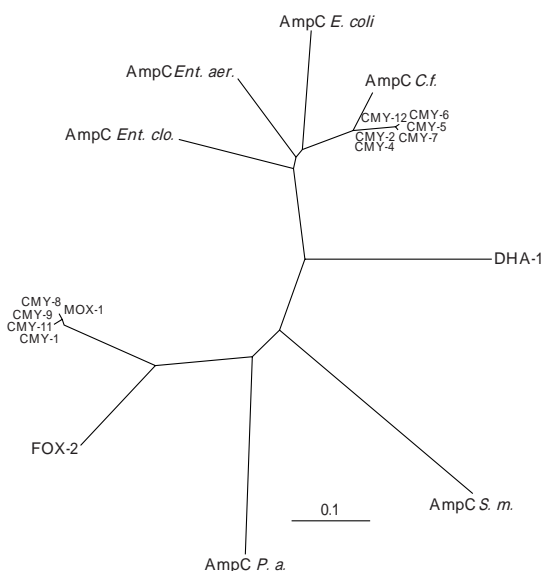
3) GES型 β -ラクタマーゼ

GES型 β -ラクタマーゼとしては、GES-1やGES-2

が報告されているが、特にGES-2はイミペネムを分解するという性質を示す²⁷⁾。国内では、GES-3、GES-4型のヴァリアントが確認されている。GES-3型は一般

表3 CTX-M型 β -ラクタマーゼの遺伝的関連とグループ

CTX-M-1 グループ	CTX-M-2 グループ	CTX-M-8 グループ	CTX-M-9 グループ	CTX-M-25 グループ
CTX-M-3	Toho-1	<i>Kluyvera georgiana</i> の	CTX-M-14	CTX-M-26
CTX-M-10	CTX-M-4	染色体性 β -ラクタマーゼ	CTX-M-16	
CTX-M-12	CTX-M-5	に近い	CTX-M-17	
CTX-M-15	CTX-M-7		CTX-M-18	
UOE-1	CTX-M-20		CTX-M-21	
CTX-M-22	CTX-M-31		CTX-M-24	
CTX-M-28			CTX-M-27	
CTX-M-29				
CTX-M-30			Toho-2	

図8 クラスC型の β -ラクタマーゼの遺伝的関連

的にGES-1型に類似した性質を示すが、GES-4型はCMY型のように阻害剤に抵抗性を示し、また、セファマイシンやカルバペネムを分解する等の性質を示すため、薬剤耐性のパターンからのみでは他の β -ラクタマーゼとの識別が困難である。

4) Sme-1, NMC-A型 β -ラクタマーゼ

カルバペネムを分解するクラスAの β -ラクタマーゼとしてSme-1, NMC-A型 β -ラクタマーゼが、海外から幾つか報告されている^{28,29)}が、国内ではあまり確認されていない。しかし最近、メタロ- β -ラクタマーゼを産生することなくカルバペネムに耐性を獲得した株が散見されるため、そのような株の中にSme-1, NMC-A型 β -ラクタマーゼなどを産生する株が潜んで

いるかもしれない。

2. クラスC型 β -ラクタマーゼ

クラスC型 β -ラクタマーゼの全体的な遺伝的相関を図8に示す。

1) AmpC型 β -ラクタマーゼ

緑膿菌や*S. marcescens*, *Enterobacter*属, *Citrobacter*属などが染色体性に保有するampC遺伝子に依存して産生される誘導型のセファロスポリナーゼである。AmpRなどによる誘導型の発現制御機構が壊れ、構成性 (constitutive) に多量のAmpCを産生するCAZ耐性株等も報告されている^{30,31)}。また、 β -ラクタマーゼの活性部位を構成している領域のアミノ酸配列が一部重複したり欠失することにより、酵素の活性ポケットの立体的・空間的な構造が変化し、セファロスポリンやセファマイシンを効率良く分解することが可能となったAmpCの変種が幾つか報告されている³²⁾。

2) CMY型 β -ラクタマーゼ

セファマイシンを分解するMIR-1が最初*K. pneumoniae*で確認された⁹⁾。筆者らも同じ時期に国内の病院に入院している泌尿器系疾患の患者より、MOX-1と命名したプラスミド性の β -ラクタマーゼを産生するセファマイシン耐性肺炎桿菌を発見し報告した¹⁰⁾。その後、この種のクラスC β -ラクタマーゼはセファマイシンを分解するという性質から、CMY型 β -ラクタマーゼとしてグループ化され連番が付与されるようになり、その後、相次いでパリアントが報告され、現在までにCMY-12までが登録されている。

我が国では、MOX-1を筆者らが最初に報告したが、さらに最近、これに近縁のCMY-9を発見し報告した¹¹⁾。また、台湾などからは、MOX-1やCMY-9に近縁のCMY-8が報告されており³³⁾、MOX-1のグループは、アジア地域に広く広がりつつあるCMY型 β -ラクタマーゼと考えられる (図8)。一方、CMY-2型を産生する*Salmonella*属菌や*E. coli*が、北米カナダの家畜などからしばしば分離されており^{35,36)}、研究者らにより

監視が進められている。

3) DHA-型 -ラクタマーゼ

DHA-型 -ラクタマーゼは、CMY-型 -ラクタマーゼと同様に伝達性プラスミドにより媒介されており、現在までにDHA-4までの4種類が確認されている。AmpC類似のセファロスポリナーゼである。*Morganella morganii*の染色体性AmpCに近い関係にあり³⁷⁾、それが起源となった可能性が示唆されている。*Salmonella*属や*Klebsiella*属でしばしば確認されている³⁸⁾。

3. クラスB型 -ラクタマーゼ

クラスB型に属するメタロ- -ラクタマーゼの全体的な遺伝的相関を図9に示す。

1) 染色体性メタロ- -ラクタマーゼ

Stenotrophomonas maltophilia (旧名, *Pseudomonas maltophilia*, *Xanthomonas maltophilia*)は、古くからL-1型メタロ- -ラクタマーゼを染色体性に産生しカルバペネムには生来耐性を示すことが良く知られている³⁹⁾。また、*Chryseobacterium meningosepticum* (旧名*Flabobacterium meningosepticum*)や*C. indologenes*などもBlaBやGOB-1, IND-1型などのメタロ- -ラクタマーゼを産生する株が多い⁴⁰⁾。また、*Bacteroides fragilis*の一部の株は、CfiAやCcrAと呼ばれるメタロ- -ラクタマーゼを染色体依存性に産生しているが、一部の菌株では、CfiAの産生能が接合で伝達することも報告されている⁴¹⁾。さらに、*Aeromonas hydrophila*の一部にはCphA型と呼ばれる別種のメタロ- -ラクタマーゼ産生する株がある⁴²⁾。なお、*Bacillus cereus*などでもII型 -ラクタマーゼと命名されているメタロ- -ラクタマーゼを産生する株があるが、II型 -ラクタマーゼは、主としてセファロスポリナーゼ活性を示し、カルバペネムの分解活性は弱いとされている⁴³⁾。これらのメタロ- -ラクタマーゼを産生する株を簡便に識別する方法を筆者らは考案⁴⁴⁾し、(株)栄研化学より供給している。これは、安価なメルカプト酢酸ナトリウムを用いる方法であり、PCR装置等特殊な機器を必要としないため日常的な臨床検査の業務の中に即導入可能であり、多くの方々より好評を頂いている。

2) プラスミド媒介性メタロ- -ラクタマーゼ

a) IMP-型メタロ- -ラクタマーゼ

筆者らが1994年に世界で最初にその存在を確認したIMP-1型 -ラクタマーゼの遺伝子は、多くの場合、*P. aeruginosa*や*S. marcescens*などにおいて伝達性プラスミドにより媒介されており、しかもクラス1のインテグロンに担われているものが多い⁴⁵⁾。ただし、一部の菌株では、クラス3型のインテグロンに担われているものもある¹⁷⁾。IMP-1を産生する菌種としては、

腸内細菌科では、*S. marcescens*はもとより、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*属, *Citrobacter*属など広範囲に及んでおり、一方、ブドウ糖非発酵菌群では、*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Acinetobacter*属菌, *Burkholderia cepacia*, *Alcaligenes*属菌など広範囲に及んでいる⁴⁶⁾。また、そのヴァリエーションも既にIMP-13までが登録されている。遺伝的には、図10に示すごとく幾つかの小グループに細分され、IMP-1のグループとIMP-2のグループはPCRで識別可能である。しかし、IMP-1, IMP-3, IMP-6を識別可能なPCRプライマーの設定は困難である。

b) VIM-型メタロ- -ラクタマーゼ

他方、プラスミドにより媒介されている別種のメタロ- -ラクタマーゼとしてVIM-型が知られている。VIM-型はこれまでにVIM-6まで6種類の亜型が確認されている。遺伝的には、VIM-2, -3, -6のグループとVIM-1, -4, -5のグループの2つに大別される(図9)。カルバペネムを分解する活性はIMP-型とほぼ同程度であるが、国内でも各地からVIM-2型メタロ- -ラクタマーゼ産生株が複数の施設で確認されている⁴⁶⁾。

4. クラスD型 -ラクタマーゼ

OXA型 -ラクタマーゼ(オキサシリナーゼ)は、主としてプラスミド依存性でトランスポゾンにより媒介されていることが多く、*Pseudomonas*属や*Acinetobacter*属などから分離されている。現時点までにOXA-型 -ラクタマーゼは51種類が登録されており(図11)、OXA-23~OXA-27などは、カルバペネムを分解することで知られている⁴⁷⁾。

さいごに

オキシイミノ -ラクタムを分解するいわゆるESBL

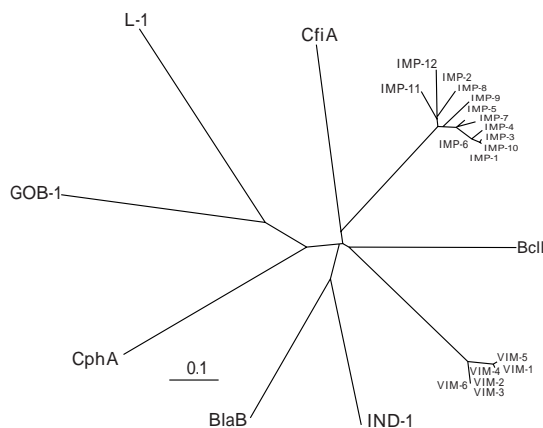


図9 クラスBのメタロ- -ラクタマーゼの遺伝的相関

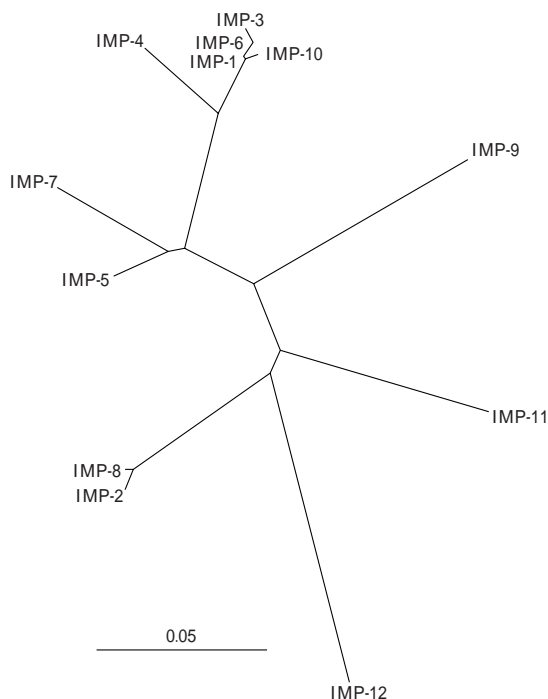


図10 IMP-1型メタル- β -ラクタマーゼの遺伝的相関

産生菌のみならず、CTX-M-型、CMY型、IMP-型、VIM-型など多種多様な β -ラクタマーゼを産生する様々なグラム陰性桿菌が、既に我が国の医療現場に侵入、定着、増殖しており、院内感染症の起因菌として問題となる場合も多い。これらの β -ラクタマーゼの種類は各々の亜型を含めると二百以上に及ぶため、それらの分類や遺伝的相関は複雑かつ渾沌とした状況を呈しつつあり、 β -ラクタマーゼを専門としている専門家でもしばしば混乱を避けられない状況となっている。臨床現場で経静脈的に投与される抗菌薬の主流は、依然としてオキシミノ β -ラクタム、セファマイシン、カルバペネムなどの広域 β -ラクタム薬であることから、この種の抗菌薬に耐性を付与する β -ラクタマーゼを産生するグラム陰性桿菌を識別することが、適性な抗菌化学療法の実施に不可欠となりつつあり、本総説の内容が日常の細菌検査や薬剤感受性試験を実施する際の参考として役立てて頂けることを願っている。

デンドログラムの作成方法

アミノ酸配列の比較解析による個々の β -ラクタマーゼの遺伝的距離の解析には、国立遺伝学研究所の多

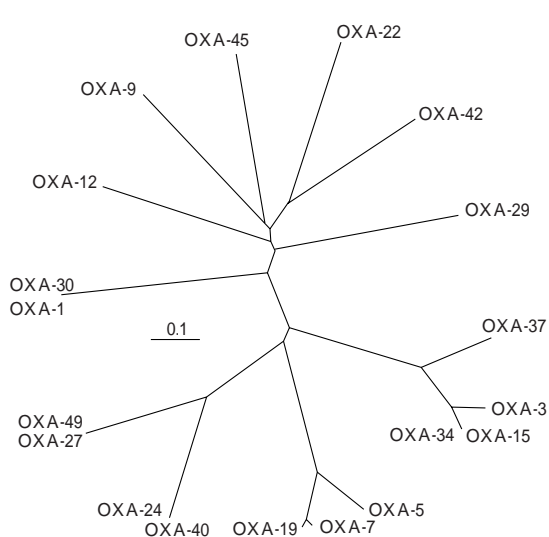


図11 OXA型 β -ラクタマーゼの遺伝的相関

重整列と系統樹作成プログラム (CLUSTALW) を用いた。

文献

- 1) Jacoby GA. 1998. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamases. Clin. Infect. Dis. 27: 81-83.
- 2) Nordmann P. 1998. Trends in beta-lactam resistance among Enterobacteriaceae. Clin. Infect. Dis. 27 Suppl. 1: S100-106.
- 3) Livermore DM, and Woodford N. 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? Curr. Opin. Microbiol. 3: 489-495.
- 4) Richmond MH, and Sykes RB. 1973. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv. Microb. Physiol. 9: 31-88.
- 5) Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 289 (1036) 321-331.
- 6) Bush K, Jacoby GA, and Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 1211-1233.
- 7) Sirot J, Chanal C, Petit A, Sirot D, Labia R, and Gerbaud G. 1988. *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae* producing novel plasmid-

- mediated β -lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies. *Rev. Infect. Dis.* 10: 850-899.
- 8) Lindberg F, Lindquist S, and Normark S. 1988. Genetic basis of induction and overproduction of chromosomal class I β -lactamase in nonfastidious gram-negative bacilli. *Rev. Infect. Dis.* 10: 782-785.
 - 9) Papanicolaou GA, Medeiros AA, and Jacoby GA. 1990. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2200-2209.
 - 10) Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Ichiyama S, Wacharotayankun R, and Kato N. 1993. Plasmid-mediated AmpC-type β -lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum β -lactams, including moxalactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 984-990.
 - 11) Doi Y, Shibata N, Shibayama K, Kamachi K, Kurokawa H, Yokoyama K, Yagi T, Arakawa Y. 2002. Characterization of a novel plasmid-mediated cephalosporinase (CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2427-2434.
 - 12) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, and Mitsuhashi S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 147-151.
 - 13) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, and Kato N. 1994. 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.
 - 14) Minami S, Akama M, Araki H, Watanabe Y, Narita H, Iyobe S, and Mitsuhashi S. 1996. Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B β -lactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 37: 433-444.
 - 15) Iyobe S, Yamada H, and Minami S. 1996. Insertion of a carbapenemase gene cassette into an integron of a *Pseudomonas aeruginosa* plasmid. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 1114-1115.
 - 16) Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, and Ohta M. 1995. Plasmid-mediated dissemination of the metallo β -lactamase gene *bla_{IMP}* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 824-829.
 - 17) Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, and Ohta M. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo β -lactamase gene *bla_{IMP}*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1612-1615.
 - 18) Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, and Hall RM. 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol. Microbiol.* 26: 731-745.
 - 19) Pena C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Linares J, Ariza J, and Gudiol F. 1998. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 53-58.
 - 20) Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishio H, Satoh K, Washidu R, Kinoshita S, and Aihara M. 2003. Production of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase and IMP-1 metallo β -lactamase by five Gramnegative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 631-638.
 - 21) Arakawa Y, Ohta M, Kido N, Fujii Y, Komatsu T, and Kato N. 1986. Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β -lactamase gene mediated by R plasmids. *FEBS Lett.* 207: 69-74.
 - 22) Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, and Ampurdanes C. 2001. SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2856-2861.
 - 23) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, and Matsuzawa H. 1995. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class

- A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2269-2275.
- 24) Arakawa Y, Ohta M, Kido N, Mori M, Ito H, Komatsu T, Fujii Y, Kato N. 1989. Chromosomal β -lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum β -lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 63-70.
- 25) Poirel L, Kampfer P, and Nordmann P. 2002. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 4038-4040.
- 26) Shiraki Y, Shibata N, Doi Y and Arakawa Y. 2004. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 β -lactamase in cattle, Japan. Emerg. Infect. Dis., in press.
- 27) Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, and Nordmann P. 2001. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2598-2603.
- 28) Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore DM, and Nordmann P. 1994. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1262-1270.
- 29) Mariotte-Boyer S, Nicolas-Chanoine MH, Labia R. 1996. A kinetic study of NMC-A β -lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins. FEMS Microbiol Lett. 143: 29-33.
- 30) Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. 2003. Amp C cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J. Antimicrob Chemother. 52: 629-635.
- 31) Hanson ND, and Sanders CC. 1999. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. Curr. Pharm. Des. 5: 881-894.
- 32) Nukaga M, Taniguchi K, Washio Y, and Sawai T. 1998. Effect of an amino acid insertion into the omega loop region of a class C β -lactamase on its substrate specificity. Biochemistry 37: 10461-10468.
- 33) Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, and Su IJ. 2000. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 1438-1442.
- 34) Carattoli A, Tosini F, Giles WP, Rupp ME, Hinrichs SH, Angulo FJ, Barrett TJ, and Fey PD. 2002. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 1269-1272.
- 35) Allen KJ, and Poppe C. 2002. Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by β -lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada. Can. J. Vet. Res. 66: 137-144.
- 36) Rankin SC, Aceto H, Cassidy J, Holt J, Young S, Love B, Tewari D, Munro DS, and Benson CE. 2002. Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. J. Clin. Microbiol. 40: 4679-4684.
- 37) Verdet C, Arlet G, Barnaud G, Lagrange PH, Philippon A. 2000. A novel integron in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, carrying the *bla*_{DHA-1} gene and its regulator gene *ampR*, originated from *Morganella morganii*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 222-225.
- 38) Fortineau N, Poirel L, and Nordmann P. 2001. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother. 47: 207-210.
- 39) Saino Y, Inoue M, and Mitsuhashi S. 1984. Purification and properties of an inducible cephalosporinase from *Pseudomonas maltophilia* GN12873. Antimicrob Agents Chemother. 25: 362-365.
- 40) Rossolini GM, Franceschini N, Riccio ML, Mercuri PS, Perilli M, Galleni M, Frere JM, and Amicosante G. 1998. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B β -lactamase showing a broad substrate profile.

- Biochem. J. 332: 145-152.
- 41) Bandoh K, Watanabe K, Muto Y, Tanaka Y, Kato N, Ueno K. 1992. Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. J. Antibiot (Tokyo) 45: 542-547.
- 42) Massidda O, Rossolini GM, Satta G. 1991. The *Aeromonas hydrophila cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. J. Bacteriol. 173: 4611-4617.
- 43) Davies RB. 1975. Comparison of β -lactamase II from *Bacillus cereus* 569/H/9 with a β -lactamase from *Bacillus cereus* 5/B/6. Biochem. J. 145: 409-411.
- 44) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, and Goto M. 2000. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J. Clin. Microbiol. 38: 40-43.
- 45) Laraki N, Galleni M, Thamm I, Riccio ML, Amicosante G, Frere JM, and Rossolini GM. 1999. Structure of In31, a *bla*_{IMP}-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 890-901.
- 46) Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, and Arakawa Y. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan with focus on the class 3 integron, Antimicrob. Agents Chemother. 47: in press.
- 47) Afzal-Shah M, Woodford N, and Livermore DM. 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 583-588.

Classification and phylogenic relations of β -lactamases which involved with resistance to broad spectrum β -lactams

Yoshichika Arakawa

Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases

Various β -lactamases which hydrolyze broad-spectrum β -lactams have emerged worldwide. TEM-derived and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) which can inactivate oxyimino cephalosporins including ceftazidime and cefotaxime have widely been distributed over almost all geographical areas so far. CTX-M-type β -lactamases which preferentially hydrolyzes cefotaxime and ceftriaxone have also emerged in various regions on the Earth. Moreover, cephamycin-hydrolyzing CMY-type enzymes have widely been isolated from human and animals. Furthermore, carbapenem-inactivating metallo- β -lactamases such as IMP-1 and VIM-2 have already been disseminated in many clinical settings. The emergence and proliferation of these new β -lactamases with broad and extended substrate specificity has become an actual hindrance of chemotherapy. Since the classification and phylogenic relation among β -lactamases have become very complicated, I will try to rearrange and summarize the character and genetic feature of several major β -lactamases which inactivate clinically important broad-spectrum β -lactams.