

論文内容要旨

A novel metallo- β -lactamase, IMP-34, in *Klebsiella*
isolates with decreased resistance to imipenem

(イミペネムに対する感受性が低下したクレブシエラ
属が保有する新規メタロ β ラクタマーゼ, IMP-34)

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, in press.

主指導教員：末田 泰二郎教授

(応用生命科学部門 外科学)

副指導教員：檜山 英三教授

(自然科学研究支援開発センター 生命科学)

副指導教員：河野 修興教授

(応用生命科学部門 分子内科学)

繁本 憲文

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

広島県における基質拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生菌のサーベイランスにおいて、メロペネム(MEPM)に耐性を持ちながら同系統の薬剤であるイミペネム (IPM) に感受性を示す *Klebsiella pneumoniae* を同定してきた。その特殊な表現型から ISMRK (Impipenem-susceptible meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*)と名づけた。ISMRK のβ-ラクタム感受性特性は、この菌がプラスミド上に保有する *bla*_{IMP-6}に由来することを明らかにしてきた。*bla*_{IMP-6}は *bla*_{IMP-1}と1塩基異なるが、この1塩基の差を ARMS-PCR 法で判別する方法を開発し、報告した。

今回、近畿耐性菌研究会で収集され、メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)を産生するが IPM に対して感受性ないし中間耐性を示す *Klebsiella* 属について検討した。ARMS-PCR 法にて 15 株は *bla*_{IMP-6} 保有株、1 株は *bla*_{IMP-1} 保有株であった。残りの *K. pneumoniae* 3 株、*K. oxytoca* 2 株は、IPM に対する MIC が 2 μg/ml、MEPM に対する MIC が 2~8 μg/ml であり、aztreonam に対しては感受性であった。

PCR にて *bla*_{IMP-1} 群遺伝子が同定されたため、PCR 法によるインテグロンマッピングと塩基配列決定を行い、新規 *bla*_{IMP} 型遺伝子を同定した。*bla*_{IMP-1}と6塩基異なり、そのうち A314G の変異により 105 番目のグルタミン酸残基がグリシン残基に変化していることが示された。この新しい変異遺伝子を *bla*_{IMP-34}と名付けた。この遺伝子はインテグロン上に存在し、カセットの上流に *qacF*、*aacA4*、下流には *qacE2*が存在した。

*bla*_{IMP-34}を含むインテグロンがプラスミド上に存在するか、接合伝達試験を行うことにより確認した。レシピエントには Chloramphenicol に耐性化させた大腸菌 BL21 を用いた。ホスホマイシン耐性以外の耐性を獲得した大腸菌が得られ、PCR およびシークエンスにて *bla*_{IMP-34}が伝達されたことが示された。プラスミドのパルスフィールドゲル電気泳動および *bla*_{IMP-34} 特異的プローベを用いたサザンハイブリダイゼーションの結果、この大腸菌と臨床分離された 5 株は同様のプラスミドを保有していた。

*bla*_{IMP-34}を含むインテグロンを検出するため 9 組の PCR プライマーセットを設計した。5 株は一様に予想通りのバンドが検出され、シークエンスで *bla*_{IMP-34}を保有していることが示された。

次に、IMP-34 のクローニングを行い、酵素活性を検討した。IMP-1、IMP-6、IMP-34 を発現させるため、それぞれの遺伝子を PCR にて増幅し、NdeI と BamHI にて切断した pET39b にライゲーションした。挿入配列をシークエンスにて確認し、BL21 (DE3) にて発現させた。微量液体希釈法にて MIC を測定した。IMP-34 発現株は IPM に対する MIC が IMP-6 発現株より高いものの、MEPM に対しては低い MIC を示した。このため MEPM に対する MIC と比較し、相対的に IPM に対する MIC が高くなってきたと考えられた。

IMP グループは現在 42 の亜型が報告されている。IMP-34 は IMP-1、IMP-3、IMP-6 ときわめて類似しており、アミノ酸 1 残基ないし 2 残基異なるのみである。これら 4 つの亜型を DNA 配列で比較した場合、7 箇所の変異がみられた。同じ IMP-1 でもアミノ酸に影

響しない遺伝子変異が4箇所みられた。IMP-34 遺伝子は IMP-1 遺伝子と比較するとさらに2箇所の変異があり IMP-1 遺伝子の314番目のアデニンがグアニンに変化することで IMP-34 遺伝子となり、87番目のグルタミン酸がグリシンに置換された IMP-34 となる。IMP-34 遺伝子の640番目のアデニンがグアニンに変化すると IMP-3 遺伝子となる。IMP-6 遺伝子は IMP-1 遺伝子とほぼ同一で、IMP-1 遺伝子の640番目のアデニンがグアニンに変化していた。このことから IMP-1 と IMP-6 の系譜と別に、IMP-1、IMP-34、IMP-3 は同じ系譜上にあると考えられた。

イミペネムに対して感受性ないし中間耐性を示すメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の保有する遺伝子として *bla*_{IMP-6}、*bla*_{IMP-1} 以外に新規 *bla*_{IMP-34} 遺伝子を同定した。