

【原著・基礎】

PCR法による *Prevotella* 属における β -lactamase 遺伝子の検索—*Prevotella nigrescens* TO 167 由来 carbapenemase 遺伝子の解析をもとに—

中 辻 智 子

大阪歯科大学口腔外科第1講座*

(平成13年12月3日受付・平成13年12月25日受理)

菌性感染症より分離した嫌気性グラム陰性桿菌 *Prevotella nigrescens* (*Pn*) TO 167 (imipenem: MIC > 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の carbapenemase のクローニングと口腔由来 *Prevotella* 属における β -lactamase 遺伝子の分布について検索した。Carbapenemase 遺伝子は *bla*_{IMP} を用いて PCR を行い、得られた PCR 産物を *Escherichia coli* DH 5 α でクローニングした結果 1,493 bp の DNA であった。この DNA の塩基配列を決定し、すでに報告されている *bla*_{IMP} を含め 13 種グラム陰性桿菌 β -lactamase 遺伝子の塩基配列との間で相同性を検索したところ、42.9~50.4% であった。口腔から分離された β -lactamase 産生 *Prevotella* 7 種 81 株 (4 種 29 株は imipenem: MIC \geq 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で耐性株および 7 種 52 株の imipenem 感受性株) について β -lactamase 遺伝子の分布を 15 種の PCR プライマーを用いて検討した。PCR プライマーは *Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子より設計した 2 種を含む carbapenemase 遺伝子用 PCR プライマー 5 種とこれ以外の β -lactamase 遺伝子用 PCR プライマー 10 種を用いた。その結果 *Prevotella intermedia* は class A の *Kp* CAZ, class C の *Ko* ampCA および class D の *Ab* OXA 21, *Prevotella nigrescens* は *Kp* CAZ と *Ab* OXA 21 および *Prevotella loescheii* は *Ko* ampCA の β -lactamase 遺伝子をそれぞれ保有していた。Imipenem 耐性菌からは β -lactamase 遺伝子は検出されなかった。以上の事実は、クローニングされた *Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子はすでに報告されているグラム陰性桿菌の β -lactamase 遺伝子とは異なることが示唆された。また、*Prevotella* 属には *Klebsiella* 属や *Acinetobacter* 属の β -lactamase 遺伝子に類似した遺伝子が保有されているが carbapenemase 遺伝子は、既知のものとは異なり多様であることを示唆している。

Key words: carbapenemase, *Prevotella*, β -lactamase 遺伝子

β -Lactam 薬は感染症の治療に頻繁に投与され、本邦で使用頻度をもっとも多い抗菌薬である^{1,2)}。使用頻度の増加に伴い、 β -lactam 薬耐性菌はいろいろな菌種から分離され、さまざまな感染症を難治化させている。本耐性菌の耐性機構は、 β -lactamase 産生³⁾、ペニシリン結合タンパク親和性の変化⁴⁾および薬剤の外膜透過障害⁵⁾によると考えられている。菌性感染症から頻繁に分離される嫌気性グラム陰性桿菌においては、 β -lactam 薬耐性の主体は β -lactamase であり、種々の β -lactamase が検出され、その遺伝子がクローニングされている。さらに塩基配列の決定も進み、現在 Gen Bank には 200 種以上の β -lactamase 遺伝子の塩基配列が登録されている^{6,7)}。

医科領域における通性嫌気性グラム陰性桿菌では、 β -lactamase が頻繁に報告され PCR プライマーも多数報告されている^{8~19)}。最近 β -lactamase の多くは Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) であり、多数の β -lactam 薬を分解するようになったと報告され²⁰⁾ metallo- β -lactamase の出現による carbapenem 薬耐性も明らかにされている^{21~23)}。臨床検査においては、 β -lactamase の多様化に

伴い、従来の薬剤感受性テストと簡易 β -lactamase 産生性テストの結果から抗菌薬を選択するだけでは治療効果をあげることが難しくなっている。そこで、近年では β -lactamase 遺伝子の同定を速やかに行うことができ、 β -lactamase のタイプや性状を判定できる PCR が応用されている²⁴⁾。

菌性感染症は嫌気性グラム陰性桿菌中でも *Prevotella* 属が深く関与しており、 β -lactam 薬耐性と β -lactamase 産生性の報告も多くみられ ESBL の出現も示唆されている^{25~28)}。また医科領域と同様に metallo- β -lactamase の出現による難治化も懸念される。しかし β -lactamase 遺伝子をクローニングし塩基配列を決定したとの報告はまれであり²⁹⁾ ヒト口腔由来嫌気性グラム陰性桿菌の metallo- β -lactamase を含めた β -lactamase 遺伝子の検出法は報告されておらず、分布についても明らかにされていない。

本研究では、ヒト口腔由来 *Prevotella* 属における metallo- β -lactamase の解析および β -lactamase 遺伝子の分布について検討するため、*Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子のクローニング法と塩基配列を調べた。ついで、すでに通性嫌気性グラム陰性桿菌 β -lactamase で報告されている PCR プ

*大阪府枚方市楠葉花園町 8-1

ライマーを用いて *Prevotella* 属における β -lactamase 遺伝子を検索した。

I. 材料と方法

1. Carbapenemase 遺伝子のクローニング法

1) 供試菌

菌性感染症患者から分離された imipenem (IPM) 耐性 *Pn* TO 167 を用いて carbapenemase 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定を行った。

供試菌は DMSO 添加 Todd Hewitt broth (DMSO 培地, BBL) を用いて -80°C で保存した³⁰⁾。実験に際し供試菌を CDC 処方嫌気性菌用血液寒天培地 (血液寒天培地), *Escherichia coli* DH 5 α を Luria-Bertani's 寒天培地 (LB 寒天培地, フナコシ) に増殖させ, コロニー形態グラム染色性および細胞形態を確認後, 使用した。

2) PCR による供試菌の同定と carbapenemase 遺伝子の検索

Pn TO 167 の PCR による同定は, フェノール法³¹⁾で抽出した本菌の DNA と *Pn* 同定用 PCR プライマー *Pn* 1100-1 (5'-TTATGTTACCCGTTATGATGGAAG-3') と *Pn* 1100-2 (5'-ATGGCGAAATAGGAATGAAAGT TA-3') を用い PCR で行った³²⁾。

PCR 反応液は $10\times$ 緩衝液 $2\mu\text{L}$, dNTPs $1.6\mu\text{L}$, DEPC 処理 H_2O $13.2\mu\text{L}$, *Taq* ポリメラーゼ (TaKaRa Z-*Taq*) $0.2\mu\text{L}$, $10\text{ nmol}/\mu\text{L}$ に調整した PCR プライマー各 $1\mu\text{L}$ および *Pn* TO 167 DNA $1\mu\text{L}$ を混合して作製した。反応は Thermal Cycler MP (宝酒造) を用いて, denature 94°C 1 秒 annealing 55°C 5 秒 extension 72°C 10 秒で 30 サイクル行った。PCR 産物は 2.0% アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色しバンドを UV にて発色させて確認した。一部の実験では annealing 温度を 60°C にまで上昇させた。

Pn TO 167 carbapenemase 遺伝子の検索は, すでに報告されている metallo- β -lactamase 遺伝子の PCR プライマーである *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) β -lactamase の *bla*_{IMP} を用いて^{8,9)} 前述の PCR にて行った。

3) *Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子の導入

(1) シャトルベクターへの組み込み

Pn TO 167 DNA を鋳型に *Pa bla*_{IMP} を用いて得た PCR 産物のうち $1,500\text{ bp}$ 付近の DNA を Feeze'n squeeze スピンカラム (BIO-RAD) でゲルより抽出後に精製した。ベクターにはプラスミド pHSG 298 を用い, 精製 DNA と pHSG 298 をそれぞれ *Eco*RI で切断後これらを DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造) にてライゲーションした。

(2) エレクトロポレーション法

Recipient には *E. coli* DH 5 α を用いた。Luria-Bertani's 液体培地 (LB ブロス, フナコシ) を用いて 37°C

$^{\circ}\text{C}$ で 48 時間培養した後, 集菌した。0.05 M リン酸緩衝液 (PB) で 2 回洗浄し, 10% グリセロール溶液に懸濁し, 菌液を -80°C 下で急冷凍してコンピテントセルを作製した。

ライゲーションした pHSG 298 のコンピテントセルへの導入はジーンパルサー II (BIO-RAD) を用いた。2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kanamycin (KM, 和光純薬) と 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IPM (萬有製薬) を添加した LB 寒天培地 20 mL に 4 %X-Gal (宝酒造) $30\mu\text{L}$ と 0.1 M IPTG (宝酒造) $30\mu\text{L}$ を塗抹した培地をあらかじめ用意しこれに導入された *E. coli* DH 5 α を接種した。 37°C で 24 時間好気培養後に発育した白色のコロニーを採取した。

4) 形質導入の確認

Pn TO 167 carbapenemase 遺伝子を導入した trans-conjugant (*E. coli* DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase)) の菌体より Bug buster (宝酒造) を用いてタンパクを抽出し 5~20% レディーゲル J (BIO-RAD) を用いて SDS-PAGE を行った。滅菌水にて振とう洗浄後 nitrocefin (Oxoid) を滴下し, 赤変したものを β -lactamase 陽性と判定した。対照として recipient *E. coli* 5 α を用い同様の操作を行った。

5) *E. coli* DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) に対する抗菌薬の最小発育阻止濃度測定

薬剤として IPM, panipenem (三共), meropenem (住友製薬), ampicillin (ABPC, 明治製薬) および cefmetazole (CMZ, 三共) を使用した。接種菌液は LB 寒天培地で 37°C 24 時間培養した *E. coli* DH 5 α および *E. coli* DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) のコロニーを LB ブロスに McFarland 0.5 になるように懸濁したものをを用いた³³⁾。最小発育阻止濃度 (MIC) は 5 g/L yeast extract (Difco) 添加 trypticase soy broth (TSB, Difco) を用いて日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法で測定した³⁴⁾。MIC は肉眼で発育の認められない最小濃度とし力価 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) で示した。

6) pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子の *E. coli* DH 5 α への再導入

E. coli DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) からプラスミド DNA を Quantum Prep Plasmid Maxiprep Kit (BIO-RAD) を用いて抽出後精製し, 再度 *E. coli* DH 5 α に導入した。

7) 塩基配列の決定

Pn TO 167 carbapenemase 遺伝子の塩基配列を決定するために, 前述の PCR 産物を 2.0% アガロースゲルにて電気泳動後, $1,500\text{ bp}$ 付近の DNA を 1-3)-(1) と同様に精製した。塩基配列の決定は再度 PCR 後精製し ABI PRISM 377 XL (宝酒造) にて行った。

8) DNA 相同性の検討

Pn TO 167 carbapenemase 遺伝子の塩基配列を Gen

Bank に登録されているグラム陰性桿菌の β -lactamase 遺伝子 13 種 (*Aeromonas hydrophila* (Ah) CphA 2 および type 2 d *Bacteroides fragilis* (Bf) β -lactamase *Klebsiella pneumoniae* (Kp) TEM および KPC-1 *Pa bla_{IMP}* VIM-2 および PSE-5 *Pi* class A *Serratia marcescens* (Sm) β -lactamase *Enterobacter cloacae* class A および class C および *E. coli* の β -lactamase) と比較し Genetyx-SV/RC Ver.4.0.3 (S.D.C) を用いて相同性値を求めた。

2. *Prevotella* 属における β -lactamase 遺伝子の検索法

1) 供試菌

菌性感染症患者の膿と小児唾液から分離した *Prevotella* 属 81 株を使用した。供試菌の保存と培養法は 1-1) のとおりである。

2) β -Lactamase 活性

供試菌を 5 mg/L hemin 400 mg/L L-cystine, 10 mg/L vitamin K₁ および 5 g/L yeast extract 添加 TSB で 24 時間嫌気培養した。この菌液 100 μ L に nitrocefin を 1 滴滴下し、赤変したものを β -lactamase 産生株とした。

3) 供試菌の同定法

Pn の同定は 1-2) の PCR プライマー、*Prevotella intermedia* (*Pi*) の同定は *Pi* 754-1 (5'-CAGCACCCAC AACGATATGA-3') と *Pi* 754-2 (5'-TTCCATCTTCTC TGCCTGTC-3) を用いて PCR で行った³²⁾。2.0% アガロースゲル電気泳動後 *Pi* では 754 bp *Pn* では 1,100 bp のバンドを認めるとそれぞれの菌と同定した。PCR に使用した鋳型 DNA は血液寒天培地で 37°C, 24 時間嫌気培養した菌株のコロニーからフェノール法³¹⁾で抽出された。

Pi と *Pn* 以外の供試菌は、血液寒天培地にて 37°C, 24 時間嫌気培養後発育したコロニーを使用して Api 20 A (Bio Merieux) で同定した。

4) MIC 測定法

接種菌液は血液寒天培地に 37°C で 24 時間嫌気培養後発育したコロニーを TSB に懸濁し McFarland 3.0 になるように調整し使用した³³⁾。供試薬剤および測定方法

は 1-5) のとおりである。

5) PCR 供試菌における β -lactamase 遺伝子の検索は、すでに報告されているグラム陰性桿菌の β -lactamase 遺伝子の PCR プライマー⁸⁻¹⁹⁾ 13 種を用いて PCR で行った。*Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子からは ORF 領域の 442 bp から 1,080 bp と全領域より設計した 2 種の PCR プライマーを用いた (Table 1)。DNA の抽出と PCR は 1-3) にしたがった。

II. 結 果

1. *Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子の *Pa bla_{IMP}* PCR 産物

Pn TO 167 carbapenemase 遺伝子を *Pa bla_{IMP}* を用いて PCR にて検索した結果、300 bp, 800 bp, 1,200 bp および 1,500 bp 付近にバンドを得た。このうち 1,500 bp 付近のバンドの増幅がもっとも明瞭で、annealing 温度を 60°C まで上昇させても安定していた (Fig. 1)。

2. *Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子のクローニング

1) *Pa bla_{IMP}* PCR 産物

Pn TO 167 DNA と *Pa bla_{IMP}* の PCR で得られた 1,500 bp 付近の DNA を *E. coli* DH 5 α に導入後 KM と IPM 添加培地でスクリーニングすると 7 個のコロニーが得られた。これを増菌後、抽出したプラスミド DNA と *Pa bla_{IMP}* を用いて PCR を行った結果約 1,500 bp のバンドが得られた (Fig. 2)。

2) *E. coli* DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) の β -lactamase タンパクと薬剤感受性

E. coli DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) から抽出したタンパクを SDS-PAGE で電気泳動後、nitrocefin で活性染色すると *Pn* TO 167 carbapenemase と同じ約 45 kDa のタンパクが検出された (Fig. 3)。

つぎに *E. coli* DH 5 α と *E. coli* DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) に対する供試薬剤の MIC を調べた結果、*E. coli* DH 5 α に対する carbapenem 薬の MIC は 0.125~0.25 μ g/mL, ABPC と CMZ のそれは \leq 16 μ g/mL であった。一方、carbapenemase 遺伝子を導入した *E. coli* DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167

Table 1. β -Lactamase DNA Primers

Type of β -lactamase (predicated of PCR product (bp))			
class A	class B	class C	class D
<i>Mm</i> TEM (920)	<i>Pa bla_{IMP}</i> (587)	<i>Ko</i> ampCA (420)	<i>Ab</i> OXA 21 (505)
<i>Sf</i> TEM (1,079)	<i>Pa bla_{IMP}</i> imp-Nde I	<i>Ko</i> ampCB (410)	
<i>Ec</i> Toho (780)	imp-Sm I (587)	<i>Cf</i> AmpC (840)	
<i>Sm</i> 21-mer (1,290)	<i>Pn</i> TO 167* (1,493)	<i>Ec</i> AmpC (1,100)	
<i>Kp</i> CAZ (1,044)	<i>Pn</i> TO 167** (639)	<i>Ec</i> GC (1,560)	

*all *Prevotella nigrescens* TO 167 carbapenemase gene

**442-1080 of *Prevotella nigrescens* TO 167 carbapenemase gene
CAZ: ceftazidime

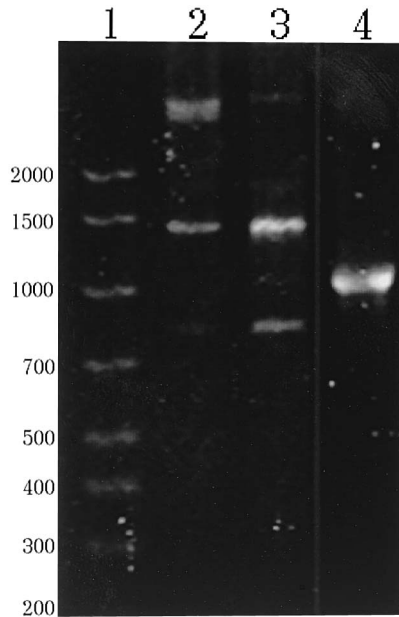


Fig. 1. PCR detection of *Pa bla_{IMP}* in *Prevotella nigrescens* TO 167.

Lane 1: molecular size marker, Lane 2: *Prevotella nigrescens* TO 167 (annealing at 60°C), Lane 3: *Prevotella nigrescens* TO 167 (annealing at 55°C), Lane 4: Positive control (*Pn* 1,100)

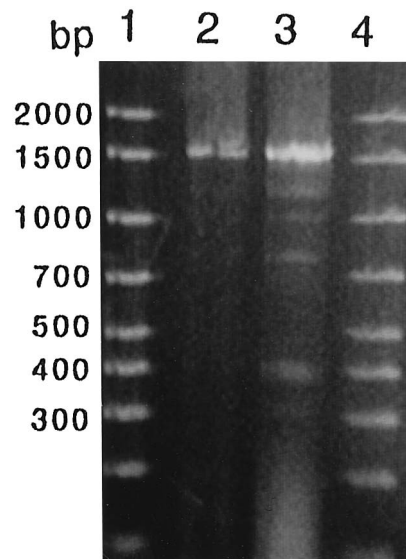


Fig. 2. PCR detection of *Pa bla_{IMP}* in *Escherichia coli* DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase).

Lane 1 and 4: molecular size marker, Lane 2: *E. coli* 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase), Lane 3: *Prevotella nigrescens* TO 167

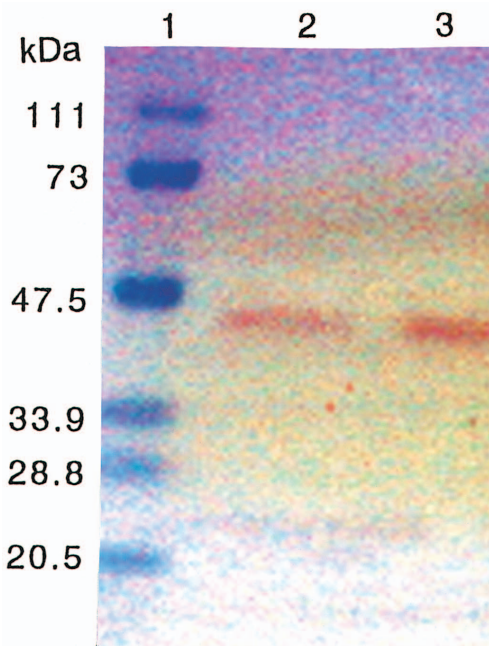


Fig. 3. SDS-PAGE of β -lactamase from *Escherichia coli* 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) and *Pn* TO 167 by nitrocefin staining.

Lane 1: molecular weight marker, Lane 2: *Prevotella nigrescens* TO 167, Lane 3: *E. coli* 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase).

carbapenemase) に対する carbapenem 薬の MIC は 32 ~512 μ g/mL, ABPC および CMZ のそれは 512 と 64 μ g/mL であり, いずれの薬剤とも recipient より大き

Table 2. MICs of 3 carbapenems, ampicillin, and cefmetazole against *Escherichia coli* 5 α and its transconjugant

β -Lactam	MIC (μ g/mL)	
	<i>E. coli</i> 5 α	<i>E. coli</i> 5 α (pHSG298/ <i>Pn</i> TO 167 carbapenemase)
Imipenem	0.25	64
Panipenem	0.125	512
Meropenem	0.125	32
Ampicillin	≤ 16	512
Cefmetazole	≤ 16	64

かった (Table 2)。

3) pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase の *E. coli* DH 5 α への再導入

E. coli DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) からプラスミドを抽出し, *E. coli* DH 5 α に再度導入し得られたコロニーを増菌後, DNA を抽出し *Pa bla_{IMP}* を用いて PCR を行うと, 1,500 bp のバンドが得られた。

3. *Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子の塩基配列

得られた DNA より, 本遺伝子の塩基配列を決定すると 1,493 bp であり, ORF を検索すると 8 か所が推定された (Fig. 4)。ORF とターミネーションコドンとの間をもっとも大きい 442~1,080 bp で分子量を求めると約 25 kDa であり, SDS-PAGE の結果 (45 kDa) より小さかった。このことより, 構造遺伝子領域は上流に存在すると考えられたので, 1~1,080 bp で分子量を求めると約 42 kDa となり SDS-PAGE の結果に類似した。

```

1   10   20   30   40
1 AGT ATG GAG TGG ATC CAT TGG CAG AGA AGT ATG CAA GTA TGG GTG
46 GAT ATG TGT ATA CGC TGG ATA ATC CGG TGA AGT TAG TGG ATA CTG
91 ATG GAC GTA TCG TAA GTT ATC CGA AGA ATC AAC GTA CAA AAA GGA
136 CAA AAG TAT ATT ATA AAA AAG ATG TTG TCT CAT CTC CAC ATG GTT
181 CAT CCA CAG CTC AAG CAA TTA TGG CCT TTG CGA CAT CTA GTA TTA
226 TTG TTT TAG GTG CTG ATG ATG CTA CAG GTA TTG GAA CTG TGG ATG
271 ATA TAG CAA TAC CAA TAG TAG GCT TAG TCG GCT TCG GAG CAT ACG
316 TCT ATA ATG AGT TTG TAA GCG CAA ATA GCA GTC CCA AAG AGT CTA
361 TCT TCT TAG CTG CAG AGC ATA CAA AAG GTG CTA GAA AAT CAA CTA
406 GTG ATA AGC ACA CTG CTC ATC GAG CCG GAT CTT CAT ATG GAC AGA
451 ATC GAA ATA GTA ACC GGG GAG ACA AAA ATA AAA AAT ATC AAA AGA
496 AAG CAA ATC CAA ATA AAC GTA AAA ATG GGA AGT AAT GGT TTC TTA
541 CTG CAA GAG GAG ACG AAG CGA ATA GAT GAA AGA TTG TCA CTT CTT
586 AAA GCC GAA TCA CAA TGG AAT AAT CTT AAA CTA TTC TTA GTA AAA
631 ATG TCA AAA AAA TAT TAT AAT GAA TCA TTC TTC TTA ACG GAA CTA
676 TCC AAT GTT TGC ACT AAG TTG GAA CAA TTG GAA GAA GCA TAT GAA
721 TAT TCA CGA AAA GCG TTT GAG TTG AAT TCC GCA GAC TAC TTG GTT
766 AAG TAT AAT TAT ATA TTT GCA TTG CTG AAC TTG GAT AGG CTA GAT
811 GAA GGT TTT GTC ATT ATT AAA CAA ATT AAA CGT GTT AGT ACA ATA
856 CAT ATA GCC TAT AGT AAA TCT GGA GAA GGT TTA AAA TGG GCT AAA
901 TCT ATA AAG AAT GAC ACG AAA TAT CTT GAA GGA GTA TAT TAT CTA
946 AAA AAA GGT TTA TTG GCT AAA GCC CAA AAA TGT TTT ACT CTA CAT
991 TTA AGG AAT AGA AGA AGA GGA ATA TAT AGT GAT TTT ACT AAA AGG
1036 CAA GTT ATG AAG AAA ATT AAT GAG TGC CTA CAC CAT CCA AAG CCA
1081 TGA CGG TGG ACC GAT GCT CCA GAC AAC GGT CAC GGA TGC ACT GGG
1126 ACG ACA TGC GGA GAG CTA TAC CGA TGC CAA GGG GCG TAA CCG TGA
1171 AAC GGT GCA GCA TGC TCG TGG TGA GGA TAT CAT GGT GAA GTA CAG
1216 CTA TGA CCC TGT CGG TCA GGT GAT GAC GGT TCA GCA TCC TAA CCG
1261 TAG GGA GAC GAA GTA TGC CTA CGA CCT ACT TGG TCG CAA ACT GAT
1306 GGT GAA CCA TCC TGA TGC TGG TGA AAC GGA TAT GAC CTA TGA TGC
1351 GGC AGG TAA CCT CCT GAC GAA AAT CAC GGC AGA GCT TAG GAA GTC
1396 GAT ATC CGA CAA GGG TTA CAT CTC TTA CAC CTA CGA CTT CGA GCG
1441 ACT CCA TGA GGT ACT TTA TCC AGA AAA TCT CTT TAA TCG TGT TAC
1486 TTA TAC CT

```

Fig. 4. DNA sequence of *Prevotella nigrescens* TO 167 carbapenemase gene (1,493 bp).

4. 他の13種β-lactamase遺伝子との相同性

E. coli DH5α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) の性状は、*Pn* TO 167 β-lactamase 遺伝子がクローニングされていることを示唆していたので、全塩基配列を用いて他の菌種由来β-lactamase 遺伝子の塩基配列との相同性を比較した。その結果、*Pa bla_{IMP}* との相同性は50.4%であった。*Ah*, *Bf*, *Kp*, *Pa*, *Pi*, *Sm*, *E. cloacae* および *E. coli* のβ-lactamase 遺伝子とは42.9~47.0%の相同性を示した (Table 3)。

5. β-Lactamase 遺伝子の検索に用いた *Prevotella* 属

供試菌を同定したところ、*Pi* 38株、*Pn* 17株、*Prevotella melaninogenica* (*Pm*) 18株、*Prevotella oralis* (*Po*) 3株、*Prevotella loescheii* (*Pl*) 3株、*Prevotella buccae* (*Pb*) 1株および *Prevotella corporis* (*Pc*) 1株であった。

供試菌でIPMに対するMICがJacobsらの結果より³⁵⁾8.0 μg/mL以上の菌株を耐性菌とすると、*Pi* (11株)、*Pn* (12株)、*Pm* (4株) および *Po* (2株) でそれぞれ耐性菌が分離された。これらIPM耐性菌に対するIPM、ABPCおよびCMZのMICは8~>512 μg/mLを示した。IPM感受性菌 (2 μg/mL以下) では、ABPCおよびCMZのMICは≤0.5~>512 μg/mLを示した (Table 4)。

6. β-Lactamase 産生 *Prevotella* 属におけるβ-lactamase 遺伝子の検索

1) 供試PCRプライマーと同じ大きさのPCR産物

グラム陰性桿菌由来β-lactamase 遺伝子のPCRプライマー13種と *Pn* TO 167 β-lactamase 遺伝子より設計したPCRプライマー2種を用いPCRにて検索した結果、16菌株から供試PCRプライマーと同じ大きさのPCR産物がみられた。*Pi* の3株は *Kp* CAZ (1,044 bp)、*Pi* の6株と *Pl* の1株は *Ko* ampCA (420 bp)、*Pi* の1株は *Ab* OXA 21 (505 bp) でそれぞれPCR産物が得られた。また、*Pi* 4株と *Pn* 1株では *Kp* CAZ と *Ab* OXA 21 のPCRプライマーで1,044 bpと505 bpのPCR産物が検出された (Table 5, Fig. 5)。

2) 供試PCRプライマーと異なる大きさのPCR産物

供試PCRプライマーの大きさとは異なったPCR産物は *Pi*, *Pn* および *Po* でそれぞれ3, 2および1株検出された。各菌株でバンドの得られたプライマーは多様で、バンドの大きさと数は異なっていた。そのうち一例として、*Pi* No.53では *Ab* OXA 21 で350 bp, 450 bp, 1,100 bp 付近および2,000 bp より大きなバンドが得られたが、*Ab* OXA 21 の505 bpのバンドはみられなかった。さらにこの株では *Kp* CAZ, *Ec* Toho, *Pa bla_{IMP}* (imp-Nde I, imp-Sm I) および 21-merPCR プライマーでもバンドがみられた (Fig. 6)。

Table 3. Sequences of homologous β-lactamase of *Pn* TO 167 carbapenemase gene and other β-lactamase gene

Class B β-lactamase	Ratio of homology (%)	Class A, C and D β-lactamase	Ratio of homology (%)
<i>Aeromonas hydrophila</i> CphA 2	46.5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> TEM	44.8
<i>Bacteroides fragilis</i> β-lactamase	44.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PSE-5	44.5
<i>Pseudomonas aeruginosa bla_{IMP}</i>	50.4	<i>Prevotella intermedia</i> class A	47.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM-2	44.7	<i>Serratia marcescens</i> β-lactamase	44.2
		<i>Enterobacter cloacae</i> class A	43.6
		<i>Enterobacter cloacae</i> class C	42.9
		<i>Aeromonas hydrophila</i> type 2 d	43.3
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC-1	44.7
		<i>Escherichia coli</i> β-lactamase	43.5

III. 考 察

β -Lactamase 遺伝子の検索法はタンパクを分離精製後アミノ酸配列を決定後塩基配列を決める方法³⁶⁾, 末端アミノ酸を決定後 PCR プライマーを設計し PCR で検出する方法²⁹⁾ および β -lactamase 遺伝子の PCR プライマーや任意に作製した PCR プライマーを応用する方法³⁷⁾ などがある。本研究では β -lactamase の基質特異性から carbapenemase 産生性が明らかになった *Pn* TO

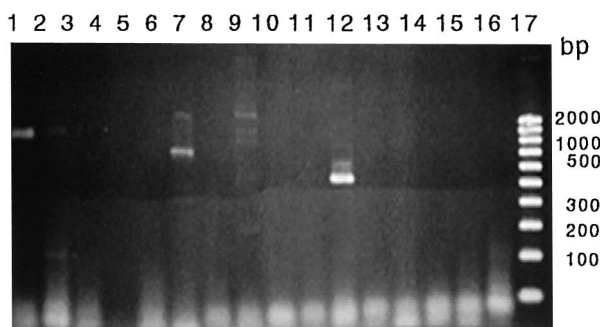
167 carbapenemase 遺伝子を通性嫌気性グラム陰性桿菌の *Pa* IMP-1 型 metallo- β -lactamase の *Pa bla*_{IMP} を用いてクローニングした。*Pn* TO 167 DNA を鋳型にし *Pa bla*_{IMP} で PCR を行うと *Pa bla*_{IMP} (587 bp) とは異なった大きさのバンドが 4 本得られた。このうち, 1,500 bp 付近のバンドは annealing 温度を 60°C まで上昇させても安定していたため, *E. coli* DH 5 α に導入した。得られた *E. coli* DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167

Table 4. MICs of imipenem, ampicillin and cefmetazole against β -lactamase-producing *Prevotella*

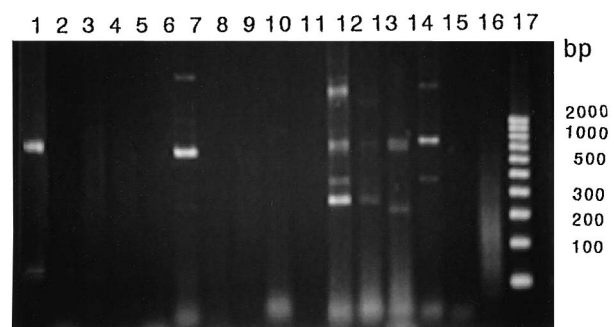
Organisms	Isolates	MIC (μ g/mL)		
		imipenem	ampicillin	cefmetazole
Imipenem-resistant bacteria*				
<i>Prevotella intermedia</i>	11	8->512	>512	>512
<i>Prevotella nigrescens</i>	12	8->512	256->512	8->512
<i>Prevotella melaninogenica</i>	4	256->512	>512	256->512
<i>Prevotella oralis</i>	2	256-512	512	512
Imipenem-sensitive bacteria				
<i>Prevotella intermedia</i>	27	\leq 0.5	\leq 0.5->512	32->512
<i>Prevotella nigrescens</i>	5	\leq 0.5	8->512	\leq 0.5->512
<i>Prevotella melaninogenica</i>	14	\leq 0.5-1	\leq 0.5->512	0.5->512
<i>Prevotella oralis</i>	1	1	>512	128
<i>Prevotella loescheii</i>	3	0.5-1	>512	64
<i>Prevotella buccae</i>	1	1	>512	>512
<i>Prevotella corparis</i>	1	1	512	32

* \geq 8 μ g/mLTable 5. Detection of β -lactamase regulatory genes from β -lactamase-producing strains of *Prevotella* by PCR assay

	Result with indicated primer		
	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Prevotella loescheii</i>
<i>Kp</i> CAZ	3	0	0
<i>Ko</i> ampCA	6	0	1
<i>Ab</i> OXA 21	1	0	0
<i>Kp</i> CAZ + <i>Ab</i> OXA 21	4	1	0

Fig. 5. PCR detection of 16 β -lactamase genes in *Prevotella nigrescens* No.14.

Lane 1: Positive control (*Pn* 1,100), Lane 2: *Pa bla*_{IMP}, Lane 3: *Ec* GC, Lane 4: *Mm* TEM, Lane 5: *Ec* AmpC, Lane 6: *Kp* ceftazidime, Lane 7: *Cf* AmpC, Lane 8: *Sf* TEM, Lane 9: *Ko* ampCB, Lane 10: *Ko* ampCA, Lane 11: *Ab* OXA 21, Lane 12: *Ec* Toho, Lane 13: *Pa bla*_{IMP} imp-Nde I, imp-Sm I, Lane 14: *Sm* 21-mer, Lane 15: *Pn* TO 167, Lane 16: *Pn* TO 167 (442-1,080), marker

Fig. 6. PCR detection of 16 β -lactamase genes in *Prevotella intermedia* No.53.

Lane 1: Positive control (*Pi* 754), Lane 2: *Pa bla*_{IMP}, Lane 3: *Ec* GC, Lane 4: *Mm* TEM, Lane 5: *Ec* AmpC, Lane 6: *Kp* ceftazidime, Lane 7: *Cf* AmpC, Lane 8: *Sf* TEM, Lane 9: *Ko* ampCB, Lane 10: *Ko* ampCA, Lane 11: *Ab* OXA 21, Lane 12: *Ec* Toho, Lane 13: *Pa bla*_{IMP} imp-Nde I, imp-Sm I, Lane 14: *Sm* 21-mer, Lane 15: *Pn* TO 167, Lane 16: *Pn* TO 167 (442-1,080), Lane 17: molecular size marker

carbapenemase) の DNA を鋳型に, *Pa bla_{IMP}* を用いて PCR を行うと, 1,500 bp 付近のバンドが得られ, 菌体から抽出したタンパクを, SDS-PAGE し, β -lactamase の活性を調べると, 45 kDa のタンパクが得られた。また, carbapenem 薬と ABPC および CMZ の MIC が親株の *E. coli* DH 5 α より著しく大きくなった。さらにベクターを抽出・精製し, *E. coli* DH 5 α に再導入して得られた *E. coli* DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) でも, *Pa bla_{IMP}* で同じバンドが確認された。以上の事実は *Pn* TO 167 carbapenemase 遺伝子が *E. coli* DH 5 α でクローニングされたことを示している。

E. coli DH 5 α (pHSG 298/*Pn* TO 167 carbapenemase) の DNA を鋳型に, *Pa bla_{IMP}* を用いて PCR で増幅した 1,500 bp 付近の DNA の塩基配列を検索した結果, 1,493 bp の大きさであった。この塩基配列の ORF を検索すると 442~1,080 bp の塩基配列が構造遺伝子の候補と推定された。そこでアミノ酸配列を推定後に分子量を求めると, SDS-PAGE で得られた 45 kDa の約 1/2 であったが上流の 1~1,080 bp では 42 kDa であったので本酵素の構造遺伝子領域は 442 bp の上流を含むと考えられる。

得られた塩基配列を用いて他菌種由来 β -lactamase 遺伝子 13 種との間で相同性値を検索すると *Pa* の IMP-1 型 metallo- β -lactamase, 嫌気性グラム陰性桿菌の *Bf* β -lactamase 他 11 種との β -lactamase の間で 42.9~50.4% であった。いずれも 60% 以下であることから, これまで報告されている metallo- β -lactamase¹⁵⁾ とは異なるものと推定されるが IMP 型³⁸⁾, *blaB* 型^{36,37,39)}, GOB-1 型^{36,37,39)} および CphA 型⁴⁰⁾ metallo- β -lactamase の塩基配列間で多様性が見られると報告されており, 本研究結果も多様性の範囲と考えられる。

Pn TO 167 carbapenemase の塩基配列から設計した PCR プライマー 2 種とすでに報告されているグラム陰性桿菌の PCR プライマー 13 種の合計 15 種を用いてヒト口腔由来 β -lactamase 産生株 *Prevotella* の DNA を鋳型に β -lactamase 遺伝子の検索を行った結果, *Pi* では class A の *Kp* CAZ class C の *Ko* ampCA および class D の *Ab* OXA 21 の β -lactamase を保有し, *Pn* は *Kp* CAZ と *Ab* OXA 21, *Pl* は *Ko* ampCA をもつことが明らかになった。また供試 PCR プライマーの大きさは異なった PCR 産物が *Pi*, *Pn* および *Po* で合計 6 菌株認められた。しかし, IPM 耐性菌では今回設計した PCR プライマーを含め metallo- β -lactamase 遺伝子は認められなかった。

これらの事実は *Prevotella* 属における β -lactamase 遺伝子が *Kp* と *Ab* 由来に類似していることを示唆している。また, 異なった大きさの増幅がみられたものでも *Pn* TO 167 carbapenemase と同様に遺伝子のクローニ

ングに応用できると考えられる。さらに *Prevotella* 属の metallo- β -lactamase 遺伝子は既知のものとは異なり, また多様性も考えられる。

歯周病や歯性感染症の発症と増悪に関する嫌気性グラム陰性桿菌において多剤耐性化に重要な役割をもつ metallo- β -lactamase の解析をさらに進めるとともに, 今回得られた PCR 産物を詳細に検討するとヒト口腔における β -lactamase 遺伝子を簡易に検出できるようになり, その分布や伝達も明らかにできると推定される。

謝 辞

稿を終えるにあたり, ご懇篤なるご指導とご校閲をいただきました大阪歯科大学口腔外科学第 1 講座 白数力也教授, 同細菌学講座 福島久典教授に深甚の謝意を表します。直接のご指導をいただきました同細菌学講座尾上孝利講師, 同口腔外科学第 1 講座 村田雄一助手, 松本和浩助手および木下 智助手に深謝いたします。本研究にご協力くださいました大阪歯科大学口腔外科学第 1 講座, 同細菌学講座各位に謝意を表します。遺伝子解析にあたり適切な助言をいただきました第一製薬株式会社創薬第一研究所 小野寺宜郷氏にお礼申し上げます。

本研究の一部は平成 12 年度大阪歯科大学学術研究奨励助成金 (A 00-07) によるものである。

本研究の要旨は, 第 48 回日本化学療法学会西日本支部総会 (平成 12 年 12 月 8 日, 京都) および第 49 回日本化学療法学会総会 (平成 13 年 5 月 31 日, 横浜) にて発表した。

文 献

- 1) 山本加代子, 影向範昭, 阪田久美子, 他: 歯科における抗菌剤の使用傾向—私立歯科大学附属 18 病院における使用実態調査—. 歯科薬物療法 18: 84~91, 1999
- 2) 玉利一也, 野田浩司: 産業医科大学病院における抗生物質の使用状況。化学療法の領域 14: 1411~1418, 1998
- 3) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, et al.: A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. FEMS Microbiol Lett 184: 53~56, 2000
- 4) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, et al.: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 45: 1693~1699, 2001
- 5) Buscher K H, Cullmann W, Dick W, et al.: Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 31: 703~708, 1987
- 6) Vila J, Navia M, Ruiz J, et al.: Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived β -lactamase in *Acinetobacter*

- baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 41: 2757~2759, 1997
- 7) Lauretti L, Riccio M L, Mazzariol A, et al.: Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 43: 1584~1590, 1999
 - 8) Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, et al.: Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. Antimicrob Agents Chemother 42: 2006~2011, 1998
 - 9) Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, et al.: PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla*_{IMP}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. J Clin Microbiol 34: 2909~2913, 1996
 - 10) Terrier F, Arpin C, Allery A, et al.: Molecular characterization of TEM-21 β -lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother 42: 2125~2127, 1998
 - 11) Siu L K, Ho P L, Yuen K Y, et al.: Transferable hyperproduction of TEM-1 β -lactamase in *Shigella flexneri* due to a point mutation in the pribnow box. Antimicrob Agents Chemother 41: 468~470, 1997
 - 12) Yagi T, Kurokawa H, Senda K, et al.: Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strains carrying multiple Toho-1-like β -lactamase genes. Antimicrob Agents Chemother 41: 2606~2611, 1997
 - 13) Matsumura N, Minami S, Mitsunashi S: Sequences of homologous β -lactamases from clinical isolates of *Serratia marcescens* with different substrate specificities. Antimicrob Agents Chemother 42: 176~179, 1998
 - 14) Chanal C, Poupart M C, Sirot D, et al.: Nucleotide sequences of CAZ-2, CAZ-6, and CAZ-7 β -lactamase genes. Antimicrob Agents Chemother 36: 1817~1820, 1992
 - 15) Laraki N, Franceschini N, Rossolini G M, et al.: Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 43: 902~906, 1999
 - 16) Marchese A, Arlet G, Schito G C, et al.: Characterization of FOX-3, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase from an Italian of *Klebsiella oxytoca*. Antimicrob Agents Chemother 42: 464~467, 1998
 - 17) Bret L, Chanal-Claris C, Sirot D, et al.: Chromosomally encoded AmpC-type β -lactamase in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 42: 1110~1114, 1998
 - 18) Nukaga M, Haruta S, Tanimoto K, et al.: Molecular evolution of a class C β -lactamase extending its substrate specificity. J Biological Chemistry 270: 5729~5735, 1995
 - 19) Vila J, Navia M, Ruiz J, et al.: Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 41: 2757~2759, 1997
 - 20) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, et al.: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 39: 2269~2275, 1995
 - 21) Chu Y W, Afzal-Shah M, Houang E T, et al.: IPM-4, a novel metallo- β -lactamase *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob Agents Chemother 45: 710~714, 2001
 - 22) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al.: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 35: 147~151, 1991
 - 23) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, et al.: 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
 - 24) 千田一嘉, 荒川宜親, 一山 智, 他: 全国で臨床分離された緑膿菌でのPCR法によるmetallo- β -lactamase産生株の検出。緑膿菌感染症研究会30回講演記録93~96, 1996
 - 25) Van Winkelhoff A J, Winkel E G, Barendregt D, et al.: β -Lactamase producing bacteria in adult periodontitis. J Clin Periodontol 24: 538~543, 1997
 - 26) Bernal L A, Gullot E, Paquet C, et al.: β -Lactamase-producing strains in the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral Microbiol Immunol 13: 36~40, 1998
 - 27) Smith S I, Aweh A J, Coker A O, et al.: Lactobacilli in human dental caries and saliva. Microbios 105: 77~85, 2001
 - 28) 木下 智: 歯性感染症における細菌の β -lactam薬耐性化に関する研究。日本化学療法学会雑誌44: 136~142, 1996
 - 29) Madinier I, Fosse T, Giudicelli J, et al.: Cloning and biochemical characterization of a class A β -lactamase from *Prevotella intermedia*. Antimicrob Agents Chemother 45: 2386~2389, 2001
 - 30) 栗林信仁: 歯性感染症由来 *Prevotella buccae* の new quinolone 耐性。歯科医学60: 221~231, 1997
 - 31) Coligan J E, Kruisbeek A M, Margulies D H, et al.: Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. In Current protocols in immunology. vol. 2. U.S.A.: John Wiley & Sons, 1994: 10.1.1~10.1.3
 - 32) Guillot E, Mouton C: PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. J Clin Microbiol 35: 1876~1882, 1997
 - 33) 竹田美文: 病原細菌の生化学的検査法。p.425, 医学書院, 東京, 1985
 - 34) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告: 微量液体希釈によるMIC測定法(微量液体希釈法)―日本化学療法学会標準法―。Chemotherapy 38: 102~105, 1990
 - 35) Jacobs M R, Spangler S K, Appelbaum P C: Beta-lactamase production and susceptibility of US and European anaerobic gram-negative Bacilli to beta-lactams and other agents. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 11: 1081~1093, 1992

- 36) Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, et al.: Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2023~2027, 2000
- 37) Bellais S, Leotard S, Poirel L, et al.: Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Chryseobacterium (Flavobacterium)* indologenes. *FEMS Microbiol Lett* 171: 127~132, 1999
- 38) Rossolini G M, Franceschini N, Riccio M L, et al.: 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, 1998
- 39) Bellais S, Aubert D, Naas T, et al.: Molecular and biochemical heterogeneity of class B β -lactamase in *Chryseobacterium (Flavobacterium)* meningosepticum. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1878~1886, 2000
- 40) Segatore B O, Massidda G, Satta D, et al.: High specificity of cphA-encoded metallo- β -lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE 036 for carbapenems and its contribution to β -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1324~1328, 1993

PCR detection of β -lactamase genes in *Prevotella* spp.: Based on analysis of *Prevotella nigrescens* TO 167 carbapenemase gene

Tomoko Nakatsuji

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka Dental University,
8-1 Kuzuhahanazono-cho, Hirakata, Osaka 573-1121, Japan

We studied carbapenemase gene cloning of anaerobic gram-negative rod *Prevotella nigrescens* TO 167 (MIC, imipenem resistant $>32 \mu\text{g}/\text{mL}$) isolated from odontogenic infection and the distribution of β -lactamase genes in β -lactamase-producing *Prevotella*. The *Prevotella nigrescens* TO 167 carbapenemase gene was cloned in *Escherichia coli* 5 α transconjugants using PCR products of *bla*_{IMP}, and the DNA fragment related to this enzyme considered to be extracted from the transconjugant was 1,493 bp. DNA homologous for this carbapenemase gene and the β -lactamase gene from 13 gram-negative rods, including *bla*_{IMP}, was 42.9-50.4%. β -lactamase genes were detected by PCR using *Prevotella* (81 strains) isolated from oral cavity. The 15 primers used in this study were designed from 14 β -lactamase genes including carbapenemase genes. Amplification by PCR with primers was observed in imipenem-susceptible strains of *Prevotella*: for *Kp* CAZ (class A), *Ko* ampCA (class C), and *Ab* OXA 21 (class D) from *Prevotella intermedia*; for *Kp* CAZ and *Ab* OXA 21 from *Prevotella nigrescens*; and for *Ko* ampCA from *Prevotella loescheii*. The β -Lactamase gene was not detected in imipenem-resistant strains. These results suggest that the *Prevotella nigrescens* TO 167 carbapenemase gene cloned differed from previous reported β -lactamase genes. We concluded that carbapenemase genes were different from known carbapenemase genes and that there is variety in *Prevotella*. And β -lactamase genes of *Prevotella* were similar to those of *Klebsiella* and *Acinetobacter*.