

医療機関における薬剤耐性菌検出状況—特に基質拡張型 β —ラクタマーゼ (ESBL) とメタロ β —ラクタマーゼ遺伝子保有株の検出状況

八柳 潤 今野貴之 斉藤志保子

基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) とメタロ β -ラクタマーゼ遺伝子の遺伝子診断技術を導入し、2002 年 4 月から 2005 年 12 月までに 249 株の ESBL 産生疑い株、2001 年 9 月から 2005 年 12 月までに 146 株のメタロ β -ラクタマーゼ産生疑い株の同定を実施した。供試した 249 株のうち 67 株が *bla*_{TEM} 陽性、4 株が *bla*_{SHV} 陽性、121 株が *bla*_{CTX-M} 陽性であった。また、146 株のうち 85 株が IMP 型、15 株が VIM 型メタロ β -ラクタマーゼ遺伝子陽性であった。秋田県では欧米で主流とされている TEM 型や SHV 型 ESBL 産生菌はまれであり、CTX-M 型 ESBL 産生菌が主流であること、秋田県内に VIM 型メタロ β -ラクタマーゼ遺伝子保有株が浸淫していることが初めて明らかとなった。これらの薬剤耐性菌は通常の抗生物質による治療が困難な感染症や、院内感染などの医原性感染症を惹起するなど医学的だけではなく社会的にも深刻な健康被害をもたらす。これらのことから、今後も県内における薬剤耐性菌の浸淫実態と耐性機構の解明に取り組み、県民に提供される医療の質の向上に資する必要がある。

1. はじめに

抗生物質に耐性を示す薬剤耐性菌は臨床上的のみならず院内感染対策上も問題とされている。 β -ラクタマーゼはペニシリン、セフェムなどの β -ラクタム薬を加水分解して不活化する酵素である。 β -ラクタマーゼのうち、TEM-1 型や SHV-1 型などのペニシリナーゼは主としてペニシリンを加水分解し、セフォタキシムやセフトジジムなどの第 3 世代セフェム剤を加水分解することはできないが、1983 年以降構造遺伝子の点変異により基質特異性が拡張し、第 3 世代セフェム系抗生物質の加水分解能を獲得した TEM 型、または SHV 型 β -ラクタマーゼが報告され、これらは基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) と呼ばれている¹⁾。また、*Kluyvera* 属菌の染色体性遺伝子に由来する CTX-M 型 ESBL²⁾は特にセフォタキシムを効率良く加水分解する。ESBL 産生菌は第 3 世代セフェム薬を不活化することから临床上、あるいは院内感染対策上問題となっている。ESBL が活性中心にセリン残基を保有するのに対して、活性中心に亜鉛を保有する β -ラクタマーゼはメタロ β -ラクタマーゼと呼ばれ、「最後の砦」とよばれる抗生物質であるカルバペネム系薬を加水分解するだけではなく、全ての β -ラクタム薬を加水分解して不活化する³⁾ことから临床上大きな問題となっている。

これらの薬剤耐性菌を精度良く同定すること

は临床上や院内感染対策上重要であるが、その同定には耐性遺伝子の検出・同定が必須であることから、一般の検査室ではスクリーニング検査の域を脱し得ないのが現状である。

我々は医療機関検査室からの要望に応じて ESBL とメタロ β -ラクタマーゼ遺伝子の遺伝子診断技術を導入し、2002 年 4 月から 2005 年 12 月までに 249 株の ESBL 産生疑い株、2001 年 9 月から 2005 年 12 月までに 146 株のメタロ β -ラクタマーゼ産生疑い株の同定を実施したので、その結果から明らかとなった秋田県における ESBL とメタロ β -ラクタマーゼ産生株の分離状況について報告する。

2. 材料と方法

2.1 供試株

2002 年 4 月から 2005 年 12 月までに医療機関から送付された ESBL 産生疑い株 249 株、2001 年 9 月から 2005 年 12 月までに送付されたメタロ β -ラクタマーゼ産生疑い株 146 株を供試した。

2.2 ESBL 遺伝子の検出と同定

被検株について PCR により ESBL 関連遺伝子である *bla*_{TEM}⁴⁾、*bla*_{SHV}⁵⁾、*bla*_{CTX-M}⁶⁾を検出した。*bla*_{TEM} が検出された場合、得られた増幅断片のシーケンスをダイレクトシーケンスにより決定し、Updated version of the Basic Local Alignment

Search Tool (BLAST) program at the National Center for Biotechnology Information server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) online search を使用してペニシリナーゼ型か ESBL 型かどうかを判別した。シーケンスを行わない場合には、市販ディスクを使用するクラブラン酸とセフトジジム、セフトキシムのシネルジーテストを実施し ESBL かどうかの判定を試みた。

2.3 メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子の検出

被検株について既報⁷⁾の PCR により IMP 型と VIM 型メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子を検出した。

3. 結果と考察

3.1 ESBL 遺伝子保有株の検出状況

表 1 に示すとおり、供試した 249 株のうち 67 株が *bla*_{TEM} 陽性、4 株が *bla*_{SHV} 陽性、121 株が *bla*_{CTX-M} 陽性で 57 株からはいずれの遺伝子も検出されなかった。*bla*_{TEM} 陽性となった 67 株のうち 40 株がシーケンスを実施した結果ペニシリナーゼ遺伝子である TEM-1 遺伝子であることが判明した。ESBL 型 TEM としては TEM-104 型遺伝子が 1 株のみ検出された。残り 26 株についてはシーケンスを未実施であるが、これらの一部についてはシネルジーテストによりペニシリナーゼ型 TEM である可能性が示唆された。SHV 型遺伝子についてはシーケンス未実施である。一方、CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株は 121 株 (48.6%) と供試株の約半数を占めることが明らかとなった。なお、TEM 遺伝子単独保有株は 33 株、CTX-M 遺伝子単独保有株は 86 株、TEM 遺伝子と CTX-M 遺伝子を保有する株が 34 株、SHV 遺伝子と CTX-M 遺伝子を保有する株が 1 株あった。

3.2 メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子保有株の検出状況

図 1 に PCR によるメタロ β-ラクタマーゼ遺伝子の検出結果の例を示した。MB-3, 4, 5, 8, 12 株からは IMP 型メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子に由来する 446bp の増幅断片が、MB-2, 6, 7, 9 株からは VIM 型メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子に由来する 391bp の増幅断片が得られた。表 2 に示すとおり、供試した 146 株のうち 85 株が IMP 型、15 株が VIM 型メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子陽性であり、46 株が陰性であった。

2002 年 4 月から 2005 年 12 月までに実施した検討により、秋田県では欧米で主流とされている TEM 型や SHV 型 ESBL 産生菌はまれであり、CTX-M 型 ESBL 産生菌が主流であることが示され、この傾向は国内他地域における傾向と同様であった。国内で主流の CTX-M 型 ESBL は CTX-M-2 と CTX-M-3 であることが報告されているが、秋田県内で検出された株の CTX-M 型 ESBL 遺伝子の型別は未実施であり、今後の検討が必要である。一方、国内で検出されるメタロ β-ラクタマーゼとしては IMP-1 型が主流であるとされてきた。実際、今回の検討でも供試株の約 58% が IMP 型メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子保有株であった。しかしながら、今回の検討で供試株の約 10 % が VIM 型メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子保有株であることが明らかとなり、秋田県内に VIM 型メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子保有株も定着していることが初めて明らかとなった。

薬剤耐性遺伝子の一部は他の菌へ伝播し、それにより薬剤耐性菌の拡散が生じることが指摘されている。実際、CTX-M 遺伝子が TEM 遺伝子とともに接合伝達性プラスミド上に存在²⁾していることが報告されており、このことが CTX-M 型 ESBL 産生菌の拡散に寄与している可能性がある。一方、メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子は Class 1 Integron と呼ばれる伝播性ユニットに Gene cassette の一部として組み込まれていることが報告されており、他菌へと拡散することが指摘されている。実際、我々は秋田県の医療機関で分離された VIM-2 型メタロ β-ラクタマーゼ遺伝子を保有する *Pseudomonas aeruginosa* の Class 1 Integron を解析し、これらの株が VIM-2 遺伝子を組み込んだ Gene cassette を包含する Class 1 Integron を保有していることを明らかにした⁷⁾。このように、秋田県内においても CTX-M 型 ESBL 遺伝子やメタロ β-ラクタマーゼ遺伝子他菌へと実際に伝播している可能性が考えられることから、今後これらの遺伝子の性状を詳細に検討し伝播機構の詳細に関する知見を集積して拡散予防策を講じる必要があるものと考えられる。

今回の検討で ESBL 産生疑い株であるにもかかわらず TEM 型、SHV 型、CTX-M 型 ESBL 遺伝子のいずれもが検出されない薬剤耐性菌、ま

たメタロ β -ラクタマーゼ産生疑い株であるにもかかわらず IMP 型と VIM 型メタロ β -ラクタマーゼ遺伝子が検出されない薬剤耐性菌が少なからず検出された。このような菌の耐性機構の詳細は不明であるが、GES, PER, VEB, あるいは SPM, GIM など、の報告が稀な ESBL やメタロ β -ラクタマーゼが関与する可能性の他に、AmpC 型セファロスポリナーゼの過剰産生^{*)}や efflux pump^{*)}などが関与する可能性があるものと推察される。実際、我々は第3世代セフェム系抗生物質に耐性を示すものの TEM, SHV, CTX-M, VIM, IMP 遺伝子が全て陰性であった *Serratia marcescens* の耐性機構を検討し、その株の耐性に変異により基質特異性が拡大した AmpC 型セファロスポリナーゼ遺伝子に起因する¹⁰⁾ことを明らかにした。このように、薬剤耐性菌の耐性機構は多彩であり、秋田県内の医療機関で分離される薬剤耐性菌の耐性機構については今後もさらなる検討を継続する必要があると考えられる。

秋田県内の医療機関に ESBL 産生菌やメタロ β -ラクタマーゼ産生菌が浸淫している事実が浮き彫りとなった。これらの薬剤耐性菌は通常の抗生物質による治療が困難な感染症や、院内感染などの医原性感染症を惹起するなど医学的だけではなく社会的にも深刻な健康被害をもたらすことに加えて、県民に提供される医療の質を著しく低下させる。今後も医療機関の要望に応えながら、県内における薬剤耐性菌の浸淫実態と耐性機構の解明に取り組むことを介して県民に提供される医療の質の向上に資する必要がある。

4. まとめ

・基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) とメタロ β -ラクタマーゼ遺伝子の遺伝子診断技術を導入し、2002 年 4 月から 2005 年 12 月までに 249 株の ESBL 産生疑い株、2001 年 9 月から 2005 年 12 月までに 146 株のメタロ β -ラクタマーゼ産生疑い株の同定を実施した結果、67 株が *bla*_{TEM} 陽性、4 株が *bla*_{SHV} 陽性、121 株が *bla*_{CTX-M} 陽性、85 株が IMP 型、15 株が VIM 型メタロ β -ラクタマーゼ遺伝子陽性株であった。

・秋田県内の医療機関で分離される薬剤耐性菌

の耐性機構については今後もさらなる検討を継続する必要がある。

5. 文献

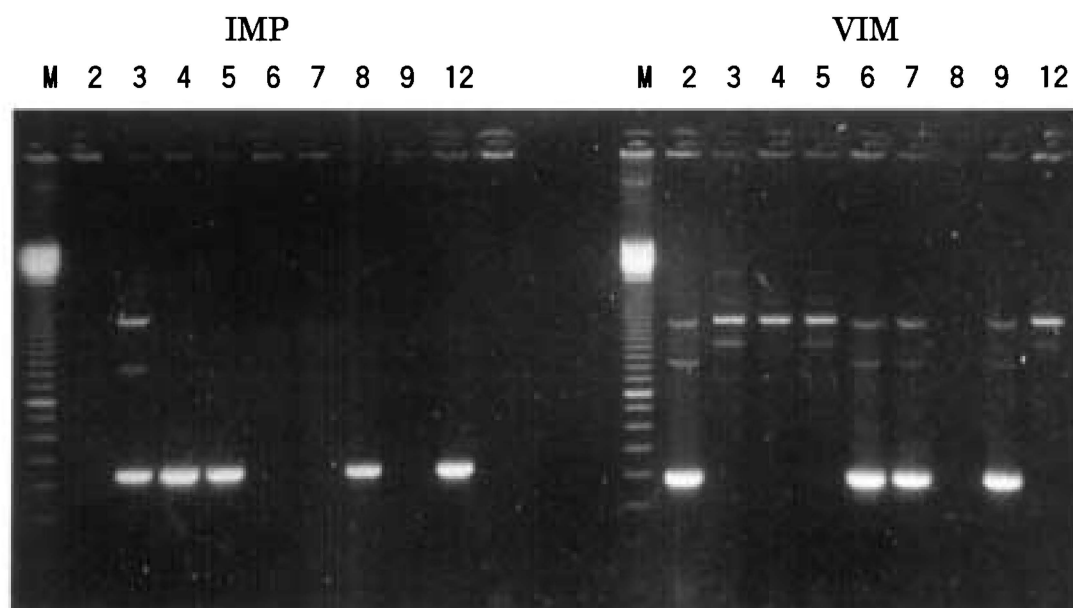
1. Paterson, D.L. and Bonomo, R.A. Extended-Spectrum β - Lactamases: a Clinical Update. Clin. Microb. Rev. 2005 ; 18 : 657-686.
2. Bonnet, R. Growing Group of Extended-Spectrum β - Lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrob. Agents Chemother. 2004 ; 48 : 1-14.
3. Walsh, T.R. et al. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? Clin. Microbiol. Rev. 2005 ; 18 : 306-525.
4. Perilli, M. et al. Molecular Characterization of extended-spectrum β -lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. J. Clin. Microbiol. 2002 ; 40 : 611-614.
5. Colom, K. et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*_{TEM}, *bla*_(SHV) and *bla*_{OXA-1} genes in *Enterobacteriaceae*. FEMS Microbiol. Lett. 2003 ; 223 : 147-151.
6. Pagani, L. et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. J. Clin. Microbiol. 2003 ; 41 : 4264-4269.
7. Yatsuyanagi, J. et al. Class 1 integron containing metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 2004 ; 48 : 626-628.
8. Jones, R.N. Important and Emerging β - Lactamase-mediated Resistances in Hospital-based Pathogens: The AmpC Enzymes. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1998 ; 31 : 461-466.
9. Piddock, L.J.V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 2006 ; 19 : 382-402.
10. Yatsuyanagi, J. et al. Nosocomial Outbreak of Ceftazidime-Resistant *Serratia marcescens* Strains That Produce a Chromosomal AmpC Variant with N235K Substitution. Jpn. J. Infect. Dis. 2006 ; 59 : 153-159.

表1 ESBL 遺伝子保有株の検出状況

供試株	TEM +	SHV +	CTX-M +	陰性
249	67 *	4	121	57
* 40 株 TEM-1 ペニシリナーゼ				

表2 メタロ β -ラクタマーゼ遺伝子保有株の検出状況

供試株	IMP +	VIM +	陰性
146	85	15	46

図1 PCRによるメタロ β -ラクタマーゼ遺伝子の検出

M：分子量マーカ－、2：MB-2 株、3：MB-3 株、4：MB-4 株、5：MB-5 株、6：MB-6 株、7：MB-7 株、8：MB-8 株、9：MB-9 株 12：MB-12 株