秋田県に侵淫している多剤耐性緑膿菌の耐性機構と有効な抗生物質の用法，分子疫学的解析技術に関する研究（第2報）

八柳　潤　　今野貴之　　齊藤志保子

平成19年3月の医療法改正により，地方衛生研究所にはMDRP院内感染が発生した際の行政対応を科学的に支援するための技術を導入・確立する責務が発生した。我々は昨年に引き続きMDRPの多剤耐性機構についてさらに検討すると共に，MDRPのPFGE解析手法について検討した。大腸菌組み換え体を作出して検討した結果，MDRPのアミカシン耐性機構に，従来知られていたaac(6')-1ae遺伝子の他にaac(6')-1a，aacA7が関与することを明らかにした。一方，薬剤排出ポンプ阻害剤であるMC207,110を使用する生化学的な手法により，MDRPのアズトレアナム，ミノマイシン，レボフロキサシン耐性機構に薬剤排出ポンプが関与していることが示された。また，ミノマイシンと薬剤排出ポンプ阻害剤の併用療法の可能性が示唆された。一方，従来の*Spe*I PFGEに*Xba*I PFGEを併用することにより，より詳細な分子疫学解析が可能となることを示した。MDRPが秋田県内の医療機関に侵淫していることが示されたことは，将来的に秋田県内でもMDRPによる院内感染事例が発生する可能性を示唆すると考えられる。その際，本事業により導入・確立したPFGE解析法により感染ルートに関する知見，また，BCプレートにより患者の治療に資する有用な抗生物質に関する知見を得ることなどにより，行政対応を科学的に支援することが可能と考える。

1. 緒言

平成22年9月に多剤耐性アシネトバクターやNDM-1メタロβラクタマーゼ薬剤耐性菌による院内感染が社会問題となった。薬剤耐性菌による院内感染はこれまでもマスコミでとりあげられる社会問題となってきたが，とりわけ，多剤耐性緑膿菌（MDRP）は死者を伴う感染事例を惹起していることから注目されている[1)]。加えて，MDRPはほぼ全ての抗生物質に耐性であるためにMDRP感染者の治療は困難を極める。平成19年3月に医療法が改正され，MDRPによる院内感染対策に行政も密接に関与する必要が出てきたことにより，地方衛生研究所にはその行政対応を科学的に支援するための技術を導入・確立する必要が生じた。そのため，本調査研究事業はMDRPの分子疫学解析手法の導入・確立，感染者の治療に資する抗生物質併用法について検討すること，さらに多剤耐性機構の解明を目的として実施した。我々はこれまで，MDRPが秋田県内全域の医療機関に侵淫していることを明らかにし，院内感染様事例の発生も示唆した。また，MDRP感染症の治療に有効であることが期待される抗生物質併用法について県内分離株を供して検討し，クリンダマイシンの有用性と抗生物質併用法の有用性を確認した[2)]。

今回，我々はMDRPの多剤耐性機構についてさらに検討すると共に，MDRPのPFGE解析手法について検討をしたので報告する。

2. 方法

2.1 アミノグリコシド修飾酵素遺伝子のクローニングと組み替え大腸菌の表現型

前報でMDRP 34株のアミカシン耐性遺伝子について検討した結果，23株がaac(6')-Iae遺伝子を保有していることを確認した[2)]。aac(6')-Iae遺伝子陰性株11株のうち，2株がaac(6')-Ia，2株がaacA7を保有することを明らかにしたが，これらのアミノグリコシド修飾遺伝子がアミカシン耐性の発現に関与しているかどうか不明であった[2)]。このため，これらのアミノグリコシド修飾遺伝子をクローニングして組み換え大腸菌を作製し，大腸菌内でその遺伝子を発現させ，その大腸菌のアミノグリコシド耐性表現型を調べることによりアミカシン耐性との関連を検討した。なお，遺伝子のクローニングと大腸菌での発現は，既報[3)]に従って実施した。

2.2 薬剤排出ポンプ阻害剤の効果

MDRPの多剤耐性機構にEfflux Pumpが関与するかどうかの検討には,県内で分離されたMDRP 24株を供試した。Efflux Pump Inhibitor (EPI) には Lomovskaya らが報告[4]した MC207,110 (Phe-Argβ-naphthyl-amide dihydrochloride) を使用した。MC207, 110不添加，40 μg/ml添加時におけるアンピシリン，アズトレアナム，ピペラシリン，イミペネム，セファゾリン，メロペネム，セフォチアム，ゲンタマイシン，セフタジジム，アミカシン，セファクリル，ミノマイシン，フルオモキセム,フォスフォマイシン,セフポドキシム,レボフロキサシンの MIC を，ドライプレートDP21を使用して測定した。MC207,110の効果はMICの低下管数で表現した。

2.3 MDRPのPFGEパターン解析

県内で分離された散発事例由来緑膿菌19株および同一医療機関で分離された,院内感染事例由来疑いMDRP 18株を供試した。PFGEはSpejerらが報告[5]した*Spe*I PFGE法に従い実施し，制限酵素に*Xba*I，*Not*Iを使用する解析も試行した。

3. 結果

3.1 アミノグリコシド修飾酵素遺伝子のクローニングと組み替え大腸菌の表現型

アミカシン耐性に関与することが報告されているaac(6')-Iae遺伝子をpBluescriptIIベクターに組み込み，lacZ遺伝子産物とのFusion Proteinとして発現させた組み換え大腸菌 JM109，*E. coli*：aac(6‘)-Iaeのアミカシンに対するMICは，表1に示すように32 μg/mlであった。菌種の違いなどにより同じ遺伝子を保有する緑膿菌と大腸菌のMICを直接比較して議論することはできないものの，このMICは感染症法に定めるアミカシンの耐性基準に合致する。前報で述べたように，MDRPに検出されたaac(6')-IaとaacA7遺伝子がアミカシン耐性に実際に関与するかどうかは不明である。このことを確認するために，同様の手法で組み換え大腸菌*E. coli*：aac(6‘)-Iaと*E. coli*：aacA7を調製し，アミカシンに対するMICを測定検討したところ,どちらの組み換え体のMICも＞32 μg/mlであった。これらの結果から，aac(6')-IaとaacA7遺伝子はいずれもMDRPのアミカシン耐性機構に関与していると考えられた。

3.2 薬剤排出ポンプ阻害剤，MC207,110による抗生物質のMIC低下

供試したMDRP 24株中3株を除き，EPIであるMC207,110の存在下（40 μg/ml）でアズトレアナム（AZT）のMICが低下することが確認された（表2）。2管を上回るMICの低下と，3管を上回るMICの低下が観察された株がそれぞれ4株と最も多く，5管を上回るMICの低下が観察された株も2株認められた。ミノマイシン（MINO）についてはMC207,110の効果が最も顕著に認められ，24株中5管を上回るMICの低下が観察された株が12株，4管を上回るMICの低下が観察された株が10株，3管を上回るMICの低下が観察された株が1株認められ，MC207,110の効果が認められない株は1株に過ぎなかった（表3）。レボフロキサシン（LVFX）についてもMC207,110の効果が認められたが,2管のMIC低下が観察された株が14株と最も多く，無効の株も3株認められ，MICの低下傾向は顕著ではなかった（表4）。なお，データは示さないがMC207,110の効果は10 μg/ml, 40 μg/mlで濃度依存的であった。また，MC207,110は40 μg/mlの濃度で供試株の発育自体には何ら影響を及ぼさなかった。

3.3 MDRPのPFGEパターン解析

MDRPの分子疫学解析手法としては，Spejerらの*Spe*I PFGEが汎用されている。今回，散発事例由来株19株と同一医療機関で分離されたMDRP 18株についてSpejerらの*Spe*I PFGEを実施した。図1（A）に示すように，散発事例由来株には多彩なPFGEパターンが認められ,この方法の解析力の高さが確認された。図1（B）に示すように，今回供試した同一医療機関由来18株は，前報[2]でも指摘したとおり，バンド数本の違いが認められるものの，*Spe*I PFGEパターンがほぼ一致していた。このことは，これらの株が院内感染を惹起していた可能性を示唆していた。この同一医療機関由来株について，*Xba*Iを使用してPFGEを試行した結果を図2に示す。（A）に示すように，*Spe*I PFGEパターンでは，バンド数本の違いがみられるがその違いは顕著ではない。一方，（B）に示す*Xba*I PFGEパターンでは，生じるバンドが全体的に低分子量となり,今回実施したSpejerの泳動条件では必ずしも最適な泳動結

果とはなっていないが，比較的高分子量のバンドに明瞭な違いが生じることがわかった。今後，パルスタイムを調整することにより，より適した泳動条件を確立する必要がある。なお，データは示さないが，*Not*I を使用して PFGE を試行したところ，バンドがスメアーとなり，解析不能な結果が得られた。

4. 考察

MDRP の多剤耐性機構について前報に引き続き検討した。前報の成績と併せて，秋田県内で確認された MDRP 34 株のうち 23 株が aac(6')-Iae，2 株が aac(6')-Ia，2 株が aacA7 遺伝子を保有し，これらの遺伝子がアミカシン耐性に関与していることが明らかになったが，残り 7 株のアミカシン耐性機構は不明であった。一方，イミペネム耐性に関与するカルバペネマーゼ遺伝子については，34 株中 31 株が IMP，1 株が VIM 型メタロ β ラクタマーゼ遺伝子を保有していることが確認されたが，2 株のイミペネム耐性機構は不明であった。このように，MDRP のアミカシンとイミペネム耐性機構はいずれも単一の遺伝子によるものではなく，種々の異なる遺伝子が関与する複雑な機構によることが確かめられた。Sekiguchi らは，神経外科病棟で発生した院内感染の起因菌であった MDRP の耐性遺伝子を解析する過程で，新たな Aminoglycoside Acethyl transferase である aac(6')-Iae を見出し [6]，MDRP のマーカーとして aac(6')-Iae が適していることを指摘している [1]。しかし，秋田県内で分離された MDRP を供試して検討した我々の成績では，34 株の MDRP のうち，この遺伝子を保有していたのは 23 株に過ぎず，この遺伝子を標的とする PCR では MDRP の診断率が約 68%に過ぎないことが明らかとなった。この矛盾の要因は明らかではないが，Sekiguchi らの成績では，PFGE パターン分類により Cluster A に分類された 212 株全てが aac(6')-Iae を保有していたのに対して，その他の Cluster に属する 2 株はいずれも aac(6')-Iae 陰性となっている。従って，今回我々が供試した秋田県内分離株には，Sekiguchi らの Cluster 分類の ClusterA に該当しない株が多く包含されていたとも推察される。このように，MDRP に特異的な遺伝子が特定されない限り，特異性と検出感度が高い MDRP の遺伝子診断法を確立することは困難と推察される。なお，今回の検討で耐性機構を特定し得なかった株については，今後，近年急速に応用範囲が広がっている次世代シークエンサーを使用して全染色体のシークエンスを決定することにより，耐性機構に関与する遺伝子を特定するなど，革新的な切り口により，耐性機構の解明にアプローチする必要があると考えられる。

薬剤排出ポンプ（Efflux Pump）が緑膿菌の薬剤耐性機構に重要な役割を果たしていることを指摘する報告は多い [4,7-10]。緑膿菌の薬剤排出ポンプは RND (resistance-nodulation-division) efflux pump に分類され，これに属する MexAB -OprM，MexCD-OprJ，MexEF-OprN，MexXY-OprM が薬剤耐性機構に重要な役割を果たしているとされている [4]。一方，MexAB-OprM 以外は緑膿菌の薬剤耐性に殆ど関与していないとする報告 [9]もある。これらの薬剤排出ポンプは主にフルオロキノロン系抗生物質に対する耐性に関与するという報告 [4,7]がある一方，テトラサイクリン，クロラムフェニコール，キノロン，マクロライド等，多種類の抗生物質に対する耐性に関与するとの報告 [9]もある。今回，我々は EPI を使う生化学的なアプローチにより MDRP の耐性機構における排出ポンプの関与を検討した。その結果，テトラサイクリン系抗生物質である MINO の MIC が MC207,110 により顕著に低下することが明らかとなり，MINO の耐性機構に薬剤排出ポンプが深く関与している可能性が示された。ニューキノロン系抗生物質の LVFX 耐性についても，これまでの報告のように排出ポンプの関与が示唆されたが，MC207,110 による LVFX の MIC は顕著ではなかった。今回の結果は，EPI と併用することにより MDRP に対する MINO の効果が顕著に増強することを in vitro で示すものであった。このことは，EPI と MINO の併用療法の可能性を示唆しており，今後のさらなる検討が必要と考えられる。

今回の検討により，MDRP の分子疫学解析手法として，現在汎用されている *Spe*I PFGE の有用性が再確認された。また，院内感染等が疑われる株については，*Xba*I PFGE を併用することが場合によっては有効となり得るものと推察される。MDRP の分子疫学的解析手法として，現在は PFGE が汎用されているが，PFGE 解析には結果が得られるまでに時間が掛かる，画像同士の比較

が困難である,結果をデータベース化することが難しい等の問題がある。最近，MDRP の解析に VNTR を応用した報告が散見されるようになってきており[11, 12]，他の細菌同様に MDRP の解析にも VNTR が今後応用されていくものと考えられる。

5. まとめ

本調査研究事業は,改正医療法に基づく行政の院内感染対応を支援するための技術を導入･確立することを目的として 2 年間実施した。その結果，MDRP が秋田県内の広域の医療機関に既に侵淫しているだけではなく,院内感染の可能性が示唆される事例が過去に発生していたことが示された。このことは，将来的に秋田県内で MDRP による院内感染事例が実際に発生する可能性があることを示すものと考えられる。そのような事例が発生し,行政がその対応に関与する必要性が実際に発生した際，本事業により導入した PFGE 解析法により感染ルートに関する知見，BC プレートにより患者の治療に資する知見を得て,行政対応を科学的に支援することが可能と考える。

参考文献

1) Jun-Ichirou Sekiguchi, Tsukasa Asagi, Tohru Miyoshi-Akiyama, Atsushi Kasai, et al.: Outbreaks of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Community Hospitals in Japan, J. Clin. Microbiol., **45**, 3, 2007, 979-989.

2) 八柳　潤, 今野貴之, 齊藤志保子: 秋田県に侵淫している多剤耐性緑膿菌の耐性機構と有効な抗生物質の用法, 分子疫学的解析技術に関する研究, 秋田県健康環境センター年報, **4**, 2008, 52-55.

3) 八柳　潤, 齊藤志保子, 今野貴之: 適切な治療を目的とした秋田県内における多剤耐性サルモネラ菌の侵淫実態解明と菌学的性状に関する調査研究, 秋田県健康環境センター年報, **3**, 2007, 53-64.

4) Olga Lomovskaya, Mark S. Warren, Angela Lee, Jorge Galazzo, et al.: Identification and Characterization of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy, Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 1, 2001, 105-116.

5) Han Spejer, Paul H. M. Savelkoul, Marc J. Bonten, Ellen E. Stobberingh, and Jeroen H. T. Tjhie: Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of Endemicity in an Intensive Care Unit, J. Clin. Microbiol., **37**, 11, 1999, 3654-3661.

6) Jun-Ichirou Sekiguchi, Tsukasa Asagi, Tohru Miyoshi-Akiyama, Tomoko Fujine, et al. : Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain That Caused an Outbreak in Neurosurgery Qard and Its aac(6')-Iae Gene Cassette Encoding a Novel Aminoglycoside Acethyltransferase, Antimicrob. Agents Chemother., **49**, 9, 2005, 3734-3742.

7) Jane Kriengkauykiat, Edith Porter, Olga Lomovskaya, and Annie Wong-Beringer: Use of an Efflux Pump Inhibitor To Determine the Prevalence of Efflux Pump-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob. Agents Chemother., **49**, 2, 2005, 565-570.

8) Shannon Westbrock-Wadman, David R. Sherman, Mark J. HIckey, Silvija N. Coulter et al.: Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Efflux Pump Contributing to Aminoglykoside Impermiability, Antimicrob. Agents Chemother., **43**, 12, 1999, 2975-2983.

9) Teresa R. De Kievit, Michael D. Parkins, Richard J. Gillis, Ramakrishnan Srikumar, et al.: Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 6, 2001, 1761-1770.

10) Julio Ramos Aires, Thilo Kohler, Hiroshi Nikaido, and Patric Plesiat: Involvment of an Active Efflux System in the Natural Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides, Antimicrob. Agents Chemother., **43**, 11, 1999, 2624-2628.

11) Turton JF et al.: Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of *Pseudomonas aeruginosa*, Clin. Microbiol. Infect., **16**, 8, 2010, 1111-1116.

12) Naze F, et al.: *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a neonatal intensive care unit: fast typing by use of high-resolution melting analysis of a variable-number tandem-repeat locus, J. Clin. Microbiol., **48**, 9, 2010, 3146-3152.

表 1　aac(6‘)-Iae, aac(6‘)-Ia, aacA7 遺伝子を発現する大腸菌組み換え体のアミカシン耐性

組み換え体	アミカシンMIC
E.coli ： aac(6‘)-Iae[1)]	32 μg/ml
E.coli ： aac(6‘)-Ia	＞32 μg/ml
E.coli ： aacA7	＞32 μg/ml

1) アミカシン耐性に関与証明

表 2　EPI MC207,110 による AZT の MIC（μg/ml）低下

EPI－[1)]	EPI＋[2)]	効果[3)]	株数
>32	>32	無効	3
>32	16	>1	3
>32	8	>2	4
>32	4	>3	4
>32	1	>5	1
16	4	2	1
16	1	4	1
16	0.5	5	1
16	<0.5	>5	1
8	4	1	1
8	1	3	2
8	0.5	4	1
4	1	2	1

1) MC207,110 非存在下における AZT の MIC（μg/ml）
2) MC207,110 40μg/ml 存在下における AZT の MIC（μg/ml）
3) MIC の低下管数

表 3　EPI MC207,110（40μg/ml）による MINO の MIC（μg/ml）低下

EPI－[1)]	EPI＋[2)]	効果[3)]	株数
>16	1	>4	1
>16	0.5	>5	1
>16	<0.5	>5	11
8	<0.5	>4	9
4	4	無効	1
4	<0.5	>3	1

1) MC207,110 非存在下における MINO の MIC（μg/ml）
2) MC207,110 40μg/ml 存在下における MINO の MIC（μg/ml）
3) MIC の低下管数

表 4 EPI MC207,110（40μg/ml)による LVFX の MIC（μg/ml）低下

EPI－[1]	EPI＋[2]	効果[3]	株数
>8	>8	無効	3
>8	4	>1	2
>8	2	>2	14
>8	1	>3	4
4	<0.5	>3	1

1) MC207,110 非存在下における AZT の MIC（μg/ml）
2) MC207,110 40μg/ml 存在下における AZT の MIC（μg/ml）
3) MIC の低下管数

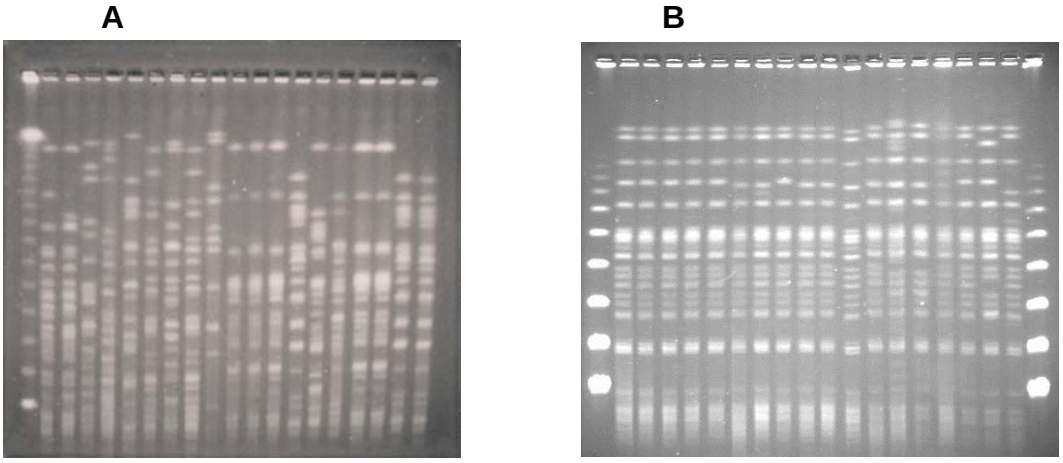

図 1　散発事例由来 *P. aeruginosa* 19 株（A）と同一医療機関由来 18 株（B）の *Spe*I PFGE パターン(Spejer et al.)

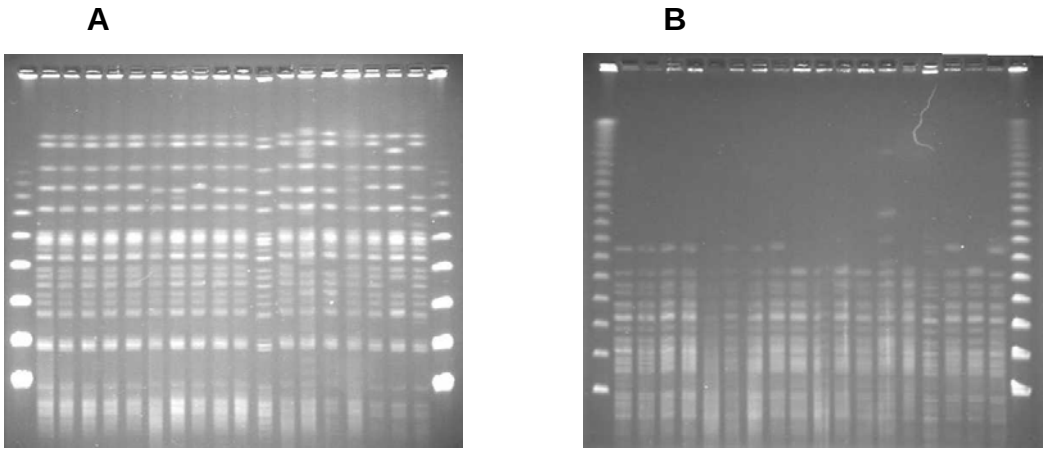

図 2　同一医療機関由来 *P. aeruginosa* 18 株の *Spe*I PFGE パターン（A）と *Xba*I PFGE パターン（B）