

秋田県の1医療機関で分離された多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* の分子疫学性状と Class 1 Integron の解析

八柳 潤 今野貴之 齊藤志保子

平成15年7月から18年9月に秋田市内の1医療機関からメタロβラクタマーゼ産生が疑われる14株のブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌が送付された。これらの分離株はいずれもIMP-1遺伝子を保有する多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* であることが判明したので、分子疫学的性状と耐性遺伝子の性状について基礎的な検討を実施した。*Xba*I PFGE パターンから分離株は同一起源と判断し得た。分離株が保有する Class 1 Integron のサイズは、株により約2.5Kb単独、約3Kb単独、約2.5Kbダブルット、約1.3Kbと2.5Kbであった。4株の Class 1 Integron のシークエンスを決定した結果、IMP-1, *aacA4*, *aadA5* を含む Gene Casette が同一 Class 1 Integron 中や、異なる Integron 間で組換え・転移した可能性が示唆された。今回供試した多剤耐性 *A. xylosoxidans* の多くが尿由来株であり、一医療機関において継続的に分離されたことは、*A. xylosoxidans* を院内感染起因菌として注視する必要があることを示唆している。今後も秋田県内における多剤耐性 *A. xylosoxidans* の動向に注視する必要があると共に、分離株の多剤耐性機構についてさらなる検討が必要である。

1. 緒言

Achromobacter xylosoxidans は好気性、ブドウ糖非発酵性、グラム陰性桿菌であり、Immuno-compromised host に敗血症、髄膜炎、肺炎、尿路感染などを惹起^{1,2)}する日和見感染菌である一方、嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis) 患者からも分離される³⁾。*A. xylosoxidans* は各種の抗生物質に耐性を示す傾向がある⁴⁾がIMP-10⁵⁾、VIM-1⁶⁾、VIM-2⁷⁾、などのメタロβラクタマーゼを産生する株も報告されており、これらの株はカルバペネムを含むβ-ラクタム薬に多剤耐性となる。

平成15年7月から18年9月に秋田市内の1医療機関からメタロβラクタマーゼ産生が疑われる14株のブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌が送付され、これらの分離株がいずれもIMP-1遺伝子を保有する *A. xylosoxidans* であることが判明した。今回は、これらの株の分子疫学的性状と耐性遺伝子の性状について基礎的な検討を実施したので、その結果を報告する。

2. 方法

表1に平成15年7月から18年9月に秋田市内の1医療機関で分離され、当所に送付された14株の *A. xylosoxidans* 供試株一覧を示す。14株中6

株は尿由来であるが、残りの株の由来は不明であった。IMPとVIM遺伝子はPCRにより検出した⁸⁾。分離株の薬剤感受性はKBディスク法とドライプレート(栄研化学)により検討した。

A. xylosoxidans 分離株の *Xba*I PFGE パターンは、Tenaらの報告⁹⁾に従って実施した。

Class 1 Integron の5' conserved region と3' conserved region に設定した既報⁸⁾のプライマーを使用して Class 1 Integron を増幅し、アガロースゲル電気泳動により増幅されたインテグロンの数とサイズを推定した。また、Mβ-127, 140, 156, 161株については、プライマーウォーキング法により増幅されたインテグロンのシークエンスを決定した。

3. 結果と考察

表1に示すように、*A. xylosoxidans* は秋田市内の某医療機関から89歳女性の尿由来株が平成15年7月17日に初めてメタロβラクタマーゼ遺伝子の確認目的で送付されて以降、平成15年に3株、16年に5株、17年に3株、18年に3株送付された。送付されたこれらの14株は、全てIMP遺伝子を保有していた。14株のうち、7株について患者の年齢性別が示され、それらはいずれも77歳以上の高齢者であった。また、6株について

由来が記載されており、それらはいずれも尿由来であったことから、当該病院において高齢患者が *A. xylosoxidans* による尿路感染を発症していたものと推察された。14 株は全て、KB 法により ABPC, CAZ, CET, CFP, CFX, CTX, EM, FOM, IPM, KM, NFLX, TC に耐性であることが示された。14 株のうち、平成 18 年 8 月 8 日に送付された 80 歳女性の尿由来 Mβ-156 株についてドライプレートを使用して MIC を測定したところ、表 2 に示すように、LVFX にのみ中等度耐性である以外、被検抗生物質全てに耐性であることが示された。以上の結果から、秋田市内の同一医療機関で平成 15 年から 18 年にかけて断続的に分離された *A. xylosoxidans* は、全て IMP 遺伝子を保有し、β-ラクタム、マクロライド、モノバクタム、カルバペネム、アミノグリコシド、ニューキノロン、テトラサイクリン、ホスホマイシンに耐性を示す多剤耐性菌であることが示された。

図 1 に 14 株の *Xba*I PFGE パターンと、保有する Class 1 Integron の Size を示す。分離株の *Xba*I PFGE パターンは非常に類似しており、Tenover の Criteria¹⁰⁾では同一起源と判断し得たが、パターンには微妙な違いが認められ、その違いに基づき、パターンを A から D に分類した。分離株が保有する Class 1 Integron のサイズは、約 2.5 Kb 単独 (Mβ-72, 82, 161), 約 3 Kb 単独 (Mβ-140, 156), 約 2.5 Kb ダブルレット (Mβ-31, 38), 約 1.3Kb と 2.5 Kb (Mβ-51, 61, 64, 65, 85, 125, 127) であり、PFGE パターンと保有 Class 1 Integron の種類に関連は認められなかった。

これらの株が保有する Class 1 Integron の構造を詳細に検討するために、Mβ-127 (約 1.3 Kb, 2.5 Kb), Mβ-140, 156 (約 3 Kb 単独), Mβ-161 (約 2.5 Kb) の Class 1 Integron のシークエンスを決定した。表 3 に示すように、Mβ-127 は 2,451 bp の Class 1 Integron (IntMβ127) と 1,295 bp の Class 1 Integron (IntMβ127S) を保有し、IntMβ127 は 5CS と 3CS の間に IMP-1 と aadA5 の Gene Cassette をコードし、また、IntMβ127S は aacA4 の Gene Cassette をコードしていた。Mβ161 は 2,452 bp の IntMβ161 を保有し、この Class 1 Integron は IMP-1 と aadA5 の Gene Cassette を保有していた。データは示さないが、Mβ161 は PCR でも aacA4 が検出されなかったことから、この株は aacA4 遺伝子を保有していないことが確かめら

れた。これに対して、Mβ161 と同様に約 2.5 Kb の Class 1 Integron を保有する Mβ-72 と Mβ-82 株はいずれも PCR で aacA4 が検出されたことから、これらの 2 株は Mβ-161 と異なる class 1 Integron を保有する可能性があり、その構造の解明は今後の課題である。Mβ-140 と Mβ-156 はいずれも 3,055 bp の Class 1 Integron (IntMβ-140, IntMβ-156) を保有し、IMP-1, aacA4, aadA5 の Gene Cassette をコードしていたが、Class 1 Integron 中の IMP-1 と aacA4 Gene Cassette の順番が異なっていた。データは示さないが、これらの 14 株は Mβ-161 を除き、いずれも PCR で aacA4, aadA5, IMP が陽性であったことから、これらの株はこの 3 遺伝子を含む Gene Cassette をコードする Class 1 Integron を保有しているものと推察される。今回、代表株の Class 1 Integron のシークエンスを決定した結果は、これらの 3 遺伝子を含む Gene Cassette が同一 Class 1 Integron 中や、異なる Integron 間で組換え・転移した可能性を示唆しており興味深い。残りの 10 株についても Class 1 Integron のシークエンスを決定し、その構造を解明する必要がある。

今回我々が検討した *A. xylosoxidans* は、14 株全て供試した β-ラクタム、マクロライド、モノバクタム、カルバペネム、アミノグリコシド、ニューキノロン、テトラサイクリン、ホスホマイシンに耐性を示す多剤耐性株であった。*A. xylosoxidans* の薬剤耐性機構には IMP-10⁵⁾, VIM-1⁶⁾, VIM-2⁷⁾, などのメタロ β ラタマーゼ、VEB-1 ESBL¹¹⁾, OXA-114¹²⁾などが関与することが報告されている。また、今回、我々はアミノグリコシド修飾酵素遺伝子である aadA5, aacA4 の存在を示した。しかしながら、*A. xylosoxidans* の多剤耐性機構の詳細は明らかになっていない。実際、これらの薬剤耐性遺伝子の存在のみで我々が検討した多剤耐性株の耐性機構を説明することは困難であると考えられ、広域な耐性スペクトルをもたらす耐性機構が同時に関与する可能性が推察される。*A. xylosoxidans* の多剤耐性機構として、平成 23 年 (2011 年) に Amoureux ら¹³⁾は初めて RND 型の多剤排出ポンプの関与を報告した。多剤排出ポンプは *Pseudomonas aeruginosa* の多剤耐性機構に関与することも知られており¹⁴⁾、今回、我々が検討した多剤耐性 *A. xylosoxidans* の多剤耐性機構にも多剤排出ポンプが関与する

かどうかに興味を持たれる。多剤排出ポンプの関与は MC-04,124 等の Efflux Pump Inhibitor (EPI) を使用することにより証明し得る¹⁴⁾ので、今後検討する必要がある。

4. まとめ

A. xylosoxidans は日和見感染菌であるとされている。今回、秋田県内の 1 医療機関で平成 15 年から 18 年にかけて多剤耐性 *A. xylosoxidans* が分離され、感染高齢者が尿路感染を発症していたことが示唆された。このことは、*A. xylosoxidans* は院内感染起因菌として注目すべき菌であることを示唆していると考えられる。今後も秋田県内における多剤耐性 *A. xylosoxidans* の動向に注視する必要があると共に、分離株の多剤耐性機構についてさらなる検討が必要である。

参考文献

- 1) Tena D, Gonzalez-Praetorius A, Perez-balsalobre M et al.: Urinary tract infection due to *Achromobacter xylosoxidans*: report of 9 cases. Scand. J. Infect. Dis., **40**, 2, 2008, 84-87.
- 2) Gomez-Cerezo J, Saurez I, Rios J et al.: *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: a 10-year analysis of 54 cases, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **22**, 6, 2003, 360-363.
- 3) Saiman L, Siegel J: Infection control in cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev., **17**, 1, 2004, 57-71.
- 4) Sader HS, Jones RN: Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric gram-negative bacilli, Int. J. Antimicrob. Agents, **25**, 2, 2005, 95-109.
- 5) Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A et al: Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain, Antimicrob. Agents Chemother., **46**, 6, 2002, 2014 - 2016.
- 6) Riccio ML, Pallecchi L, Fontana R et al: In70 of plasmid pAX22, a *bla*_{VIM-1}-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette, Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 4, 2001, 1249 - 1253.
- 7) Shin KS, Han K, Lee J et al: Imipenem-resistant *Achromobacter xylosoxidans* carrying *bla*_{VIM-2}-containing class 1 integron. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **53**, 3, 2005, 215-220.
- 8) Jun Yatsuyanagi, Shioko Saito, Seizaburo Harata, et al: Class 1 Integron Containing Metallo- β -Lactamase gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated in Japan. Antimicrob. Agents Chemother., **48**, 2, 2004, 626 - 628.
- 9) Tena D, Carranza, R, Barbera JR et al: Outbreak of long-term intravascular catheter-related bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **24**, 11, 2005, 727-732.
- 10) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al: Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing, J. Clin. Microbiol. **33**, 9, 1995, 2233-2239.
- 11) Neuwirth C, Freby C, Ogier-Desserrey A, et al: VEB-1 in *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patient, France. Emerg. Infect. Dis., **12**, 11, 2006, 1737-1739.
- 12) Doi Y, Poirel L, Paterson DL, et al.: Characterization of a naturally occurring class D β -lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. Antimicrob. Agents Chemother., **52**, 6, 2008, 1952 - 1956.
- 13) Amoureux BJ, Dues JM, Drabowicz A, et al: First description of a RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*: AxyABM, Antimicrob. Agents Chemother., 2011, E-pub.
- 14) Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O, et al: Use of 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.

表1 供試した IMP 遺伝子陽性 *A. xylosoxidans* 一覧

菌株番号 (Mβ-)	受付年月日	年齢性別	由来
31	H15.7.17	89F	尿
8	H15.10.6		尿
51	H15.11.14		
61	H16.1.16	77M	尿
64	H16.2.6	87F	尿
65	H16.2.18	84F	尿
72	H16.4.2	78M	
82	H16.7.7		
95	H17.1.12		
125	H17.9.26		
127	H17.9.29		
140	H18.1.16		
156	H18.8.8	80F	尿
161	H18.9.5	98F	

表2 Mβ-156 株の薬剤感受性 (MIC μ g/ml)

ABPC	>32	FMOX	>32	AMK	>32
PIPC	64	CPDX	>8	MINO	>16
CEZ	>32	AZT	>32	FOM	>32
CTM	>32	IPM	>16	ST	>76/4
CAZ	>32	MEPM	>16	LVFX	4 (I)
CCL	>32	GM	>16	CPFX	4 R

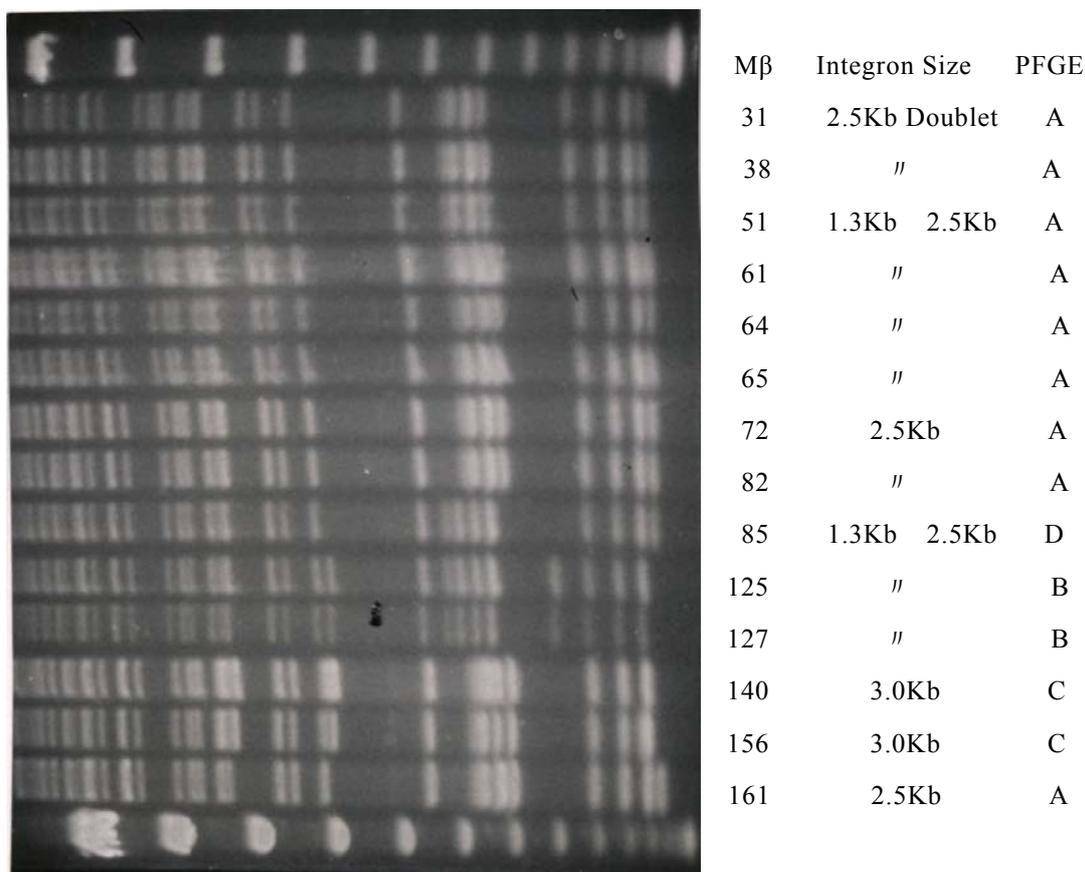


図1 *A. xylosoxidans* 14株の *Xba*I PFGEパターンと保有するインテグロンの概要

表3 DNAシーケンス解析から決定したインテグロンの構造

菌株番号	名称	サイズ	インテグロン構造
Mβ127	IntMβ-127	2,451bp	5CS-IMP-1-aadA5-3CS
	IntMβ-127S	1,295bp	5CS-aacA4-3CS
Mβ161	IntMβ-161	2,452bp	5CS-IMP-1-aadA5-3CS
Mβ156	IntMβ-156	3,055bp	5CS-IMP-1-aacA4-aadA5-3CS
Mβ140	IntMβ-140	3,055bp	5CS-aacA4-IMP-1-aadA5-3CS