

厚生労働科学研究費補助金「地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究」（平成 18 年度～）

秋田県の一医療機関で継続的に分離された多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* が保有する Class 1 Integron の解析

八柳 潤 今野貴之 齊藤志保子

我々は前報で秋田市内の 1 医療機関から送付された計 14 株の多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* が同一起源に由来し、IMP-1 遺伝子を保有すること、また、そのうち 4 株が IMP-1, *aacA4*, *aadA5* 遺伝子の Gene Cassette をコードする Class 1 Integron を保有することを報告したが、14 株の多剤耐性機構の詳細は不明であった。今回、14 株が保有する Class 1 Integron 全ての構造を決定すると共に、多剤耐性機構に薬剤排出ポンプが関与する可能性について検討した。Mβ-31, 38, 72, 82 株は 2,113 bp と 2,357 bp, Mβ-51, 61, 64, 65, 95, 125, 127 は 1,196 bp と 2,357 bp の Class 1 Integron を保有することが明らかとなり、その構造から 14 株の Class 1 Integron が Gene Cassette の組み替え、脱落、挿入過程を受けた可能性が示唆された。薬剤排出ポンプ阻害剤である Phe-Arg-β-naphthylamide により、供試した 14 株においては RND 型薬剤排出ポンプ AxyABM が多剤耐性機構に殆ど関与していない可能性が示唆された。14 株の *Achromobacter xylosoxidans* 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 (*A. xylosoxidans*) は好気性、ブドウ糖非発酵性、グラム陰性桿菌で 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。また、嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis) 患者から分離される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-ラクタム薬に耐性となる。

我々は前報⁸⁾で 2003 年 7 月から 2006 年 9 月に秋田市内の 1 医療機関から継続的に送付された 14 株のブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌の分子疫学的性状と耐性遺伝子等について検討し、これらの株が同一起源に由来し、IMP-1 遺伝子を保有する多剤耐性 *A. xylosoxidans* であることを示し、これらの株の多くが尿由来であることから多剤耐性 *A. xylosoxidans* が院内感染起因菌として重要である可能性を指摘した。また、14 株のうち 4 株の Class 1 Integron のシーケンスを解析し、これらの 4 株が IMP-1, *aacA4*, *aadA5* 遺伝子の Gene Cassette を組み込んだ Class 1 Integron を保有することを示し、これらの株が

多彩な薬剤耐性遺伝子を保有することを明らかにした。しかしながら、供試した *A. xylosoxidans* は 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り、検出された耐性遺伝子だけでは多剤耐性機構を十分に説明することはできないと考えられたことから、多剤耐性機構の詳細についてさらなる検討が必要であることを指摘した。今回、14 株が保有する Class 1 Integron 全ての構造を決定すると共に、多剤耐性機構に薬剤排出ポンプが関与する可能性について検討したので、それらの結果について報告する。

2. 方法

2.1 供試株

2003 年 7 月から 2006 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* 供試株一覧を表 1 に示す。

2.2 Class1 Integron のシーケンス解析

前報⁸⁾を踏まえて、表 2 に示すプライマーを次のとおり組み合わせた PCR により供試株の

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	2003.7.17	89F	尿
38	2003.10.6		尿
51	2003.11.14		
61	2004.1.16	77M	尿
64	2004.2.6	87F	尿
65	2004.2.18	84F	尿
72	2004.4.2	78M	
82	2004.7.7		
95	2005.1.12		
125	2005.9.26		
127	2005.9.29		
140	2006.1.16		
156	2006.8.8	80F	尿
161	2006.9.5	90F	

Class1 Integron から増幅断片を得て、それぞれの断片のシーケンスを解析し、Class 1 Integron の構造を決定した。Mβ-31, 38, 72, 82 ; INT5CS/AACA4ORFAS, AACA4ORFS/INT3CS, Mβ-51, 61, 64, 65, 95, 125 ; INT5CS/IMPAS, IMPAS/INT3CS, INT5CS/INT3CS。なお、Mβ-127, 140, 156, 161 株の Class 1 Integron の構造は前報⁸⁾で報告したとおりである。

2.3 薬剤排出ポンプ阻害剤の効果

薬剤排出ポンプの阻害剤には Phe-Arg-β-naphthylamide (Sigma)⁹⁾を使用した。14株について Phe-Arg-β-naphthylamide の毒性を検討したところ、160 μg/ml の濃度で発育が抑制

される傾向が認められた。このため、各供試株について、Phe-Arg-β-naphthylamide を非添加及び 20 μg/ml 又は 80 μg/ml 添加したミューラーヒントンブロスを使用して、ドライプレート栄研 DP31 (栄研化学) に包含されている 18 薬剤について MIC を測定した。

3. 結果と考察

表 3 に *A. xylosoxidans* 14 株が保有する Class 1 Integron の構造を示す。前報⁸⁾に示したように、分離株の PFGE パターンと保有する Class1 Integron の構造には明確な関連は認められなかった。Mβ-31, 38, 72, 82 株は 2 種類の Class 1 Integron (2,113 bp, 2,357 bp) を保有し、それぞれの Integron は株の違いによらず、いずれも同一構造・同一シーケンスであった。また、Mβ-51, 61, 64, 65, 95, 125, 127 は 2 種類の Class 1 Integron (1,196 bp, 2,357 bp) を保有し、それぞれの Integron は株の違いによらず、いずれも同一構造・同一シーケンスであった。更に、以上の株全てが保有する 2,357 bp Class 1 Integron は同一構造且つ同一シーケンスであった。Mβ140 と 156 株が保有する 3,055 bp Class1 Integron では *aacA4* Gene Cassette と IMP-1 Gene Cassette の組み替えが起きた可能性が考えられると同時に、3,055 bp Class 1 Integron は 2,357 bp Class 1 Integron の異なる位置に *aacA4* Gene Cassette が挿入されて派生したとも考えられる。また、2,357 bp Class 1 Integron は 3,055 bp Class 1 Integron から *aacA4* Gene Cassette が脱落することにより派生し得るとも考えられる。同様に、2,113 bp, 1,196 bp, 3,055 bp Class 1 Integron も Gene Cassette の脱落や挿入によりお互いに派生し得る構造となっており、14 株の *A. xylosoxidans* の Class 1 Integron が薬剤耐性遺伝子の Gene Cassette の組み替え、

表 2 Class1 Integron DNA 断片増幅・シーケンス解析用プライマー

名称	配列
INT5CS	5'-CTT CTA GAA AAC CGA GGA TGC-3'
INT3CS	5'-CTC TCT AGA TTT TAA TGC GGA TG-3'
IMPAS	5'-ACA GAT ACT GAA AAG TTA GT-3'
IMPAS	5'-TCY CCA AYT TCA CTR TGA CT-3'
AACA4ORFS	5'-ATG ACT GAG CAT GAC GTT GC-3'
AACA4ORFAS	5'-TTA GGC ATC ACT GCG TGT TC-3'

表 3 多剤耐性 *A. xylosoxidans* 14 株が保有する Class 1 Integron の構造

菌株番号	Class1 Integron の構造 (サイズ)			
Mβ-31	5'CS— <i>aacA4</i> — <i>aadA5</i> —3'CS	(2,113 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS	(2,357 bp)
Mβ-38	5'CS— <i>aacA4</i> — <i>aadA5</i> —3'CS	(2,113 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS	(2,357 bp)
Mβ-51	5'CS— <i>aacA4</i> —3'CS	(1,196 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS	(2,357 bp)
Mβ-61	5'CS— <i>aacA4</i> —3'CS	(1,196 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS	(2,357 bp)
Mβ-64	5'CS— <i>aacA4</i> —3'CS	(1,196 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS	(2,357 bp)
Mβ-65	5'CS— <i>aacA4</i> —3'CS	(1,196 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS	(2,357 bp)
Mβ-72	5'CS— <i>aacA4</i> — <i>aadA5</i> —3'CS	(2,113 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS	(2,357 bp)
Mβ-82	5'CS— <i>aacA4</i> — <i>aadA5</i> —3'CS	(2,113 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS	(2,357 bp)
Mβ-95	5'CS— <i>aacA4</i> —3'CS	(1,196 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —4'CS	(2,357 bp)
Mβ-125	5'CS— <i>aacA4</i> —3'CS	(1,196 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —5'CS	(2,357 bp)
Mβ-127	5'CS— <i>aacA4</i> —3'CS	(1,196 bp)	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —6'CS	(2,357 bp)
Mβ-140	5'CS— <i>aacA4</i> —IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS			(3,055 bp)
Mβ-156	5'CS—IMP-1— <i>aacA4</i> — <i>aadA5</i> —3'CS			(3,055 bp)
Mβ-161	5'CS—IMP-1— <i>aadA5</i> —3'CS			(2,357 bp)

脱落,挿入過程を経て今回確認された構造となった可能性が考えられ,興味深い。供試した *A. xylosoxidans* 14 株は全て 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⁸⁾。

供試した 14 株は IMP-1, *aadA5*, Mβ161 を除き *aacA4*, そしてデータは示さないがオキサシリナーゼ OXA-114 を保有していたが, これらの薬剤耐性遺伝子の存在のみで多剤耐性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た。

A. xylosoxidans の多剤耐性機構として, 2011 年に Bardo ら¹⁰⁾は初めて RND 型薬剤排出ポンプ AxyABM の関与を報告した。RND 型薬剤排出ポンプは *Pseudomonas aeruginosa* の多剤耐性機構に関与することが知られている¹¹⁾。データは示さないが, 我々は PCR により供試 14 株に AxyABM を構成する遺伝子群が存在することを示し, 供試 14 株が実際に RND 型薬剤排出ポンプ AxyABM を保有することを確認した。そこで, 我々は薬剤排出ポンプの阻害剤である Phe-Arg-β-naphthylamide を使用して秋田県で分離された *A. xylosoxidans* 14 株の多剤耐性機構に薬剤排出ポンプが関与するかどうかについて検討したところ, Phe-Arg-β-naphthylamide により濃度依存的に MIC の低下が認められた薬剤は DP31

に包含される 18 種類の薬剤の中でミノサイクリンのみであった。以上の結果は, 供試した 14 株において RND 型薬剤排出ポンプ AxyABM が多剤耐性機構に殆ど関与していないことを示唆するものと考えられる。

供試した 14 株の *A. xylosoxidans* の多剤耐性機構の詳細は依然として明らかではない。広域な耐性スペクトルをもたらす耐性機構としては多剤排出ポンプの他に Porin の消失などによる薬剤に対する細胞膜透過性の変化が知られており, 今後この可能性について検討する必要がある。一方, 近年普及してきた次世代シーケンサーを活用して供試株が保有する薬剤耐性遺伝子を網羅的に解析することも多剤耐性機構の解明には有効と考えられ, 今後の課題である。

4. まとめ

秋田県内の 1 医療機関で 2003 年から 2006 年に継続して分離された *A. xylosoxidans* は多剤耐性であることと尿路感染を惹起したことから, 院内感染原因菌として注目すべき菌であると考えられる。秋田県内の医療機関における多剤耐性 *A. xylosoxidans* の動向には今後も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**, 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**, 2003, 360-363.
- 3) saiman L, Siegel J : Infection control in cystic fibrosis. Clin. Microbial. Rev., **17**, 2004, 57-71.
- 4) Sader HS, Jones RN : Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric gram-negative bacilli. Int. J. Antimicrob. Agents, **25**, 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**, 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**, 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**, 2005, 215-220.
- 8) 八柳 潤, 今野貴之, 齊藤志保子 : 秋田県の1医療機関で分離された多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* の分子疫学的性状と Class1 Integron の解析. 秋田県健康環境センター年報, **6**, 2010, 46-50.
- 9) Lomovskaya S. et. al. : Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 2001, 105-116.
- 10) Baldo J. et al : First description of a RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*:AxyABM. Antimicrob. Agents Chemother., **55**, 2011, 4912 - 4914.
- 11) Kriengkauykit 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**, 2005, 565 -570.