

図2 薬剤耐性の形質の安定性

(S) の領域に属する感受性株を1株選び、液体培養した後希釈し、適当な寒天培地に塗布し複数の独立したコロニーを分離して再度薬剤感受性試験を実施した場合、左下の図に示されたように元株と同じ(S)の領域にのみ分布が偏る。一方、耐性株の場合には右下の図で示すように元株と同じ耐性レベルの(R)の領域に分布する。この様に、臨床分離菌の薬剤耐性度は、各々の株固有の形質であり、通常、再現性のある安定した結果が得られる。

SとRの領域に二峰性の分布を示すことが多い(図1)。SまたはRと判定された株のコロニーについて、再度、感受性試験を実施した場合、その耐性度は、ある一定の限られた範囲に分布し、SはS、RはRと再現性のある結果が安定して得られる(図2)。このRの領域に分布する菌は、通常、新しい何らかの遺伝学的耐性機序を獲得しており、それは、内在性の遺伝子の変異による場合と、外来性に新たな耐性遺伝子を獲得する場合におおまかに分けることができる(図3a)。

また、薬剤耐性という形質は、抗菌薬の分解や修飾による不活化、抗菌薬の標的部位の変化、細菌細胞膜/外膜の変化、抗菌薬の能動排出ポンプの活性化などさまざまな要因が、複雑に関連した総合的結果として現われる場合が多く<sup>6)</sup>、一元的に耐性メカニズムを説明できない場合も少なくない。薬剤耐性の詳細な分子機構の解説は、誌面の都合で省略するが、以下、主要な耐性に関わる遺伝子機構について紹介する。

### 1. 内在性の遺伝子の発現量の変化による耐性化(構造遺伝子自体の変異を伴わない)

細菌外膜のポリリン蛋白や能動輸送ポンプを構成する蛋白の量的増減は、基本的にはそれらの遺伝子のプロモーターの発現量に依存している。また、 $\beta$ -ラクタマーゼの産生量も、調節遺伝子から作られる調節蛋白によってコントロールされている。この場合、通常、構造遺伝子そのものの変化は伴わない。たとえば、 $\beta$ -ラクタム薬の存在下で、蓄積したペプチドグリカンの代謝産物を感知し、そのシグナルが調節蛋白に伝達され、その結果 $\beta$ -ラクタマーゼの産生が誘導される現象が一般的に見られる。詳しい解説は省略するが、概して言えば、細菌は環境の変化を感知する能力を持ち、抗菌薬が存在すると耐性にかかわる代謝経路などに関連する遺伝子の発現量を微妙に調節する点において、抗菌薬に抵抗する能力を有する「高等」生物であると言えるであろう。

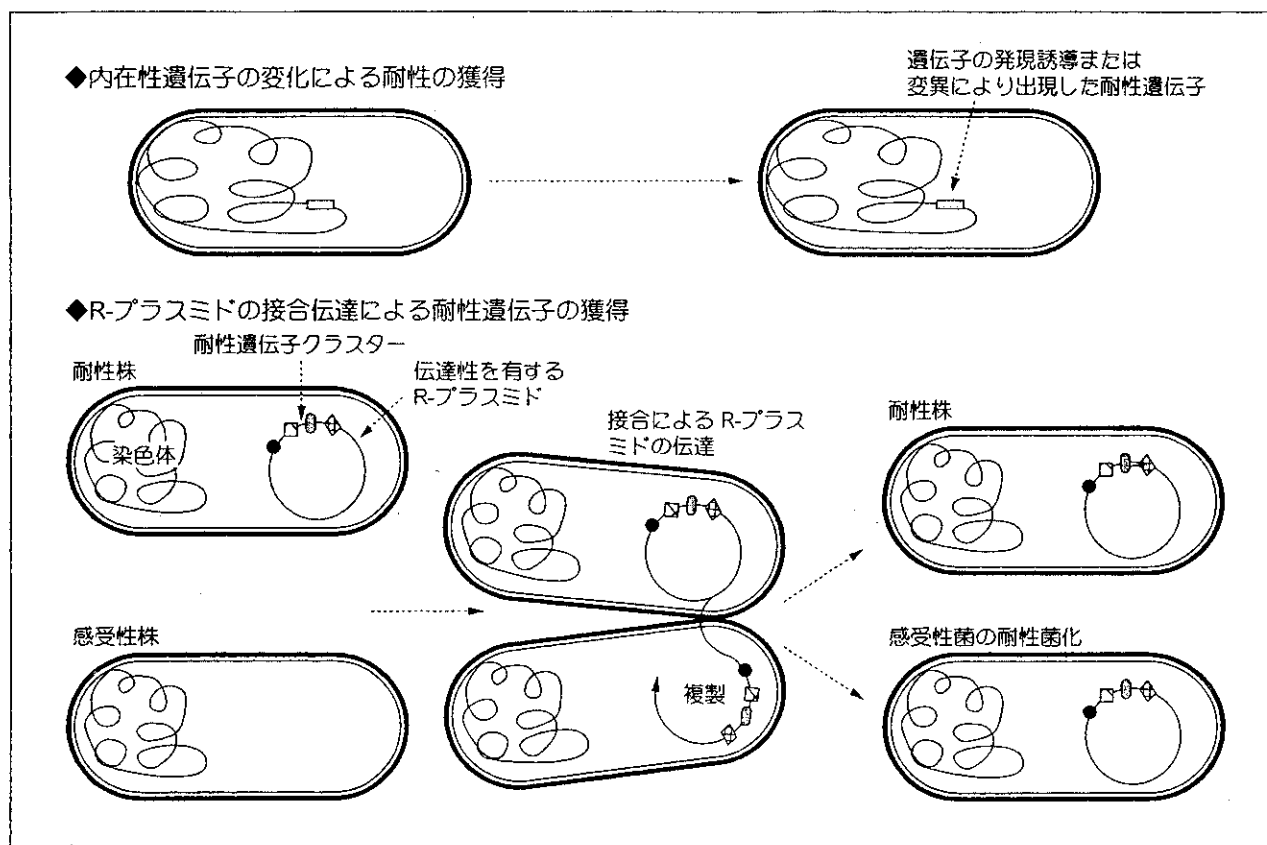


図 3a 薬剤耐性の遺伝学的背景

(R) の領域に属する耐性株を 1 株選び、遺伝学的な解析を行った場合、フルオロキノロン耐性菌の場合などでは、DNA ジャイレースやトポイソメラーゼⅣなどの内在性の遺伝子の変異が確認できる(図上)。

一方、カルバペネムやアミノグリコシド耐性を獲得する場合、耐性に関与する薬剤耐性プラスミド (R-プラスミド) の接合伝達が関与する(図下)。

## 2. 内在性の遺伝子の変異による耐性化

### 1) 遺伝子の発現を調節する領域(プロモーター領域)の変異(図 3b)

*Klebsiella oxytoca* は、染色体上にクラス A の  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を持っており、従来からペニシリンのみならず、セファロリジンなどの初期のセフェム薬に耐性を示すことがよく知られていた。しかし、その遺伝子のプロモーター領域にある塩基に一箇所変異が起るのみで遺伝子の発現が著しく高まり、酵素の産生量が増大するものが出現し、その結果、セフォペラゾンなどにも高度耐性を獲得することが知られている<sup>7)</sup>。

また、*Enterobacter* や *Citrobacter* は、染色体上に、セファロスポリナーゼ (AmpC) の遺伝子を保有しているが、その調節にかかわる複数の遺伝子 (*ampR* など) やプロモーター領域の変異により、

*ampC* 遺伝子が、恒常的に高発現するようになり、第三代セフェム薬や一部のセファマイシンに耐性を示す株がしばしば臨床分離されている<sup>8,9)</sup>。

### 2) 構造遺伝子領域の変異(図 3c)

フルオロキノロンは、DNA の複製に関与する DNA ジャイレースやトポイソメラーゼⅣに結合し、活性を阻害する抗菌薬である。耐性は、その遺伝子である *gyrA* や *parC* 遺伝子の変異による<sup>10,11)</sup>。*gyrA* や *parC* 遺伝子は多くの細菌が普遍的に持つ基本的かつ必須な遺伝子であるため、MRSA や肺炎球菌、緑膿菌、腸内細菌のみならず、インフルエンザ菌、淋菌、カンピロバクター、抗酸菌などあらゆる細菌においてフルオロキノロン耐性菌が出現しつつある。

また、最近話題となっている ESBL は<sup>12)</sup>、ペニシリナーゼの構造遺伝子領域に変異が起った結

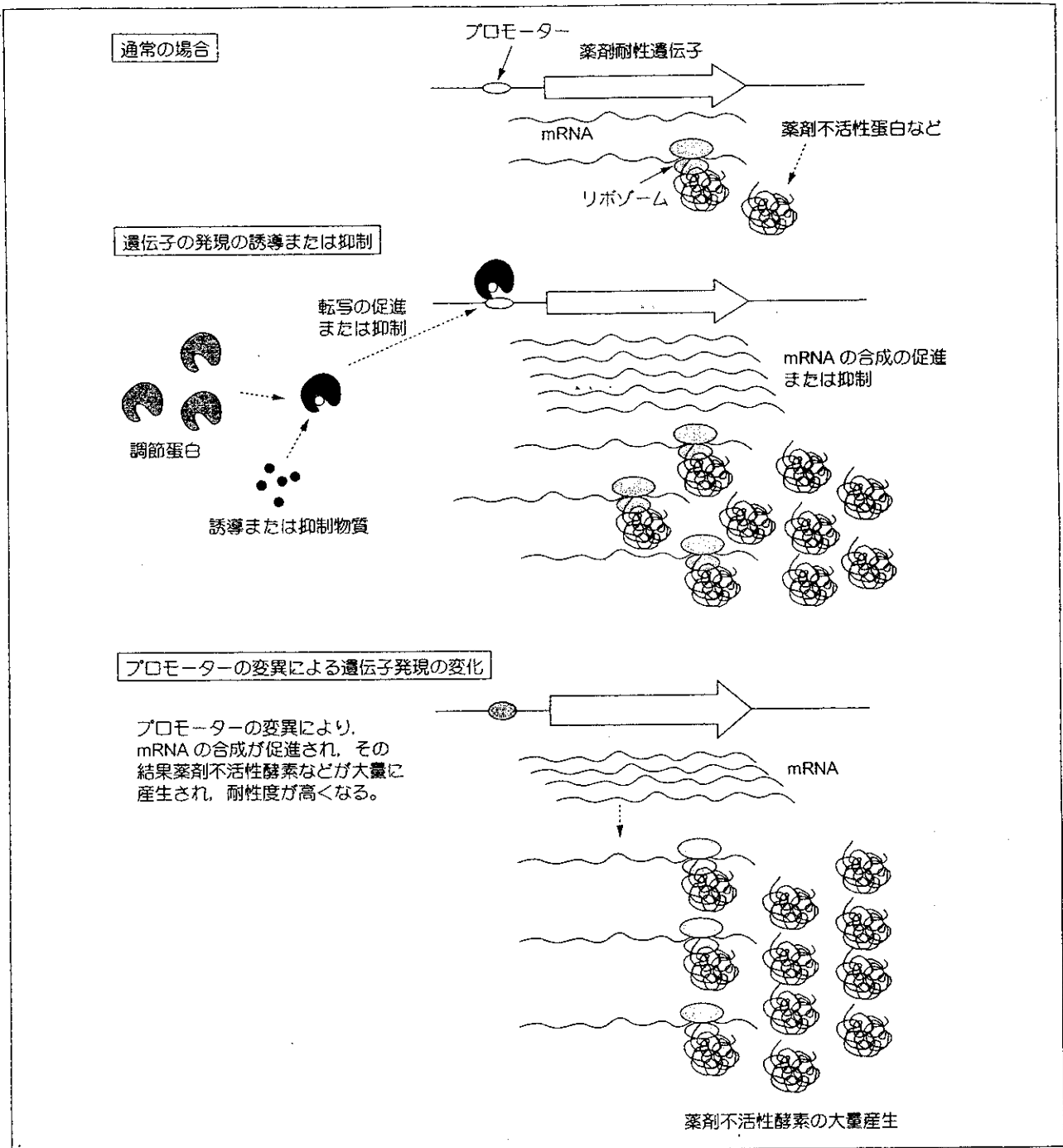


図 3b プロモーター領域の変異による耐性化

特定の薬剤耐性遺伝子の情報に基づいて、耐性に関与する酵素・蛋白が常時一定量産生されている状態(図上)。例としてR-プラスミド上のペニシリナーゼ遺伝子の発現によるアンピシリン耐性が知られている。

耐性遺伝子の発現が、誘導物質や抑制物質により調節されている場合、それらの調節因子を認識する調節蛋白が、耐性遺伝子上流に存在するプロモーターの発現を促進または抑制することにより、耐性に関与する酵素・蛋白の量を調節している状態(図中)。例として *E. cloacae* の染色体上のクラスC  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の誘導発現によるセファロスポリン耐性が知られている。

通常は、低レベルでしか発現していない弱いプロモーターの領域に突然変異などが発生し、プロモーターの発現量が亢進し、その結果、耐性に関与する酵素・蛋白の量が増加し高度耐性を獲得した状態(図下)。例として *K. oxytoca* の染色体上のクラスA  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の高発現によるセフォペラゾン高度耐性が知られている。

果、一部のアミノ酸配列が変化し、セフトジジムなどの「第三世代セフェム薬」を効率良く分解できるようにになった酵素である。

肺炎球菌におけるペニシリン耐性は、ペニシリン結合蛋白 (PBP) の 1a, 2x, 2b などの変異によるものである<sup>13)</sup>。

### 3. 外部から耐性遺伝子の獲得による耐性化

欧米で問題となっている、ESBL の遺伝子は多くの場合伝達性のプラスミド上に存在し、接合により同種や近縁の細菌に拡散する。プラスミドによって媒介されている薬剤耐性遺伝子の種類は非常に多く、サルファ剤、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン耐性遺伝子などから、各種のβ-ラクタマーゼ遺伝子、ゲンタマイシン、アミカシンなどのアミノグリコシド耐性遺伝子、さらにIMP-1メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子など多岐にわたる。最近話題の、VRE の *vanA* 遺伝子クラスターもプラスミドによって媒介されている場合が多い<sup>14)</sup>。

## V 薬剤耐性菌が臨床的に問題となる場合

臨床分離される細菌のみならず、自然環境中に存在する細菌は、通常、何らかの抗菌薬に耐性を獲得している。しかし、それら全てが臨床的に問題とされるわけではなく、ごく一部の細菌における薬剤耐性の獲得が、實際上臨床的に問題とされる。

### 1. 薬剤耐性の獲得が、治療成績や患者の死亡率、予後にマイナスの影響を及ぼす場合

非病原性の細菌における薬剤耐性は、当然のことであるが問題とはされない。人に感染症を引き起こす細菌においてのみ、耐性の獲得が問題となる。常識的にも経験的にも、薬剤耐性菌による感染症が、薬剤感受性菌による感染症より予後が悪いことは事実であると考えられるが、実際に耐性菌の感染により臨床経過や予後が悪くなるか否かを検証する疫学的研究を、人を対象としてプロスペクティブに実施することは、人道的見地からも困難な場合が多い。

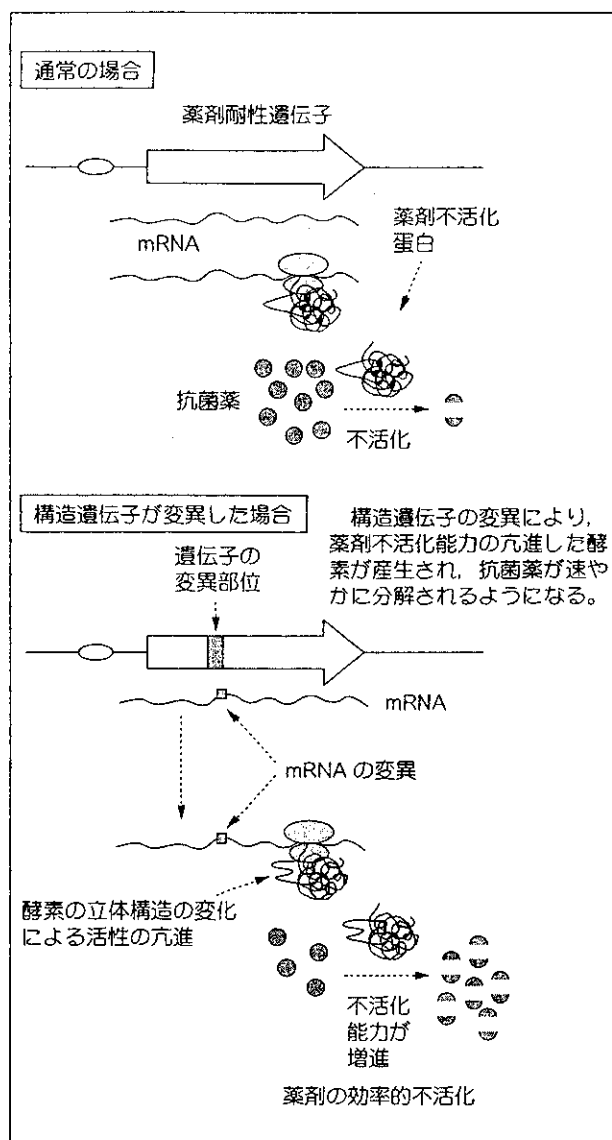


図3c 構造遺伝子領域の変異による耐性化

特定の薬剤耐性遺伝子の情報に基づいて、耐性に関与する酵素・蛋白が常時一定量産生されている状態(図上)。例としてR-プラスミド上のペニシリナーゼ遺伝子の発現によるアンピシリン耐性が知られている。耐性遺伝子内部の突然変異により、部分的にアミノ酸配列が変化した変異型酵素・蛋白が出現し、抗菌薬を効率良く分解不活化することが可能となった場合、耐性度の上昇や基質特異性の拡張が発生する(図下)。例としてペニシリナーゼ遺伝子の突然変異によるESBLの発生による「第三世代セフェム」耐性が知られている。

### 2. 通常では高い感受性が期待できる抗菌薬に対する耐性菌が出現した場合

肺炎桿菌が生来ペニシリンに耐性を示すことは良く知られており、したがって「ペニシリン耐性

表 1 主な臨床分離菌と耐性獲得が問題となる主要な薬剤

I 院内感染症 / 市中感染症起因菌	
1. グラム陽性球菌	
a.	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) バンコマイシン / テイコプラニン, アルベカシン
b.	コアグララーゼ陰性ブドウ球菌属 (CNS) (テイコプラニン / バンコマイシン)
c.	腸球菌 (VRE を含む)
①	<i>Enterococcus faecalis</i> ペニシリン, カルバペネム, (バンコマイシン / テイコプラニン)
②	<i>Enterococcus faecium</i> (バンコマイシン / テイコプラニン)
d.	肺炎球菌 ペニシリン・セフェム薬, マクロライド, フルオロキノロン, (<バンコマイシン>)
e.	化膿連鎖球菌 ペニシリン・セフェム薬, (<バンコマイシン>)
2. グラム陰性桿菌	
a.	緑膿菌および近縁のブドウ糖非発酵菌 セファマイシン, カルバペネム, アミノグリコシド, フルオロキノロン
b.	肺炎桿菌, 大腸菌, セラチアおよびその他の腸内細菌 セファマイシン, カルバペネム, アミノグリコシド, フルオロキノロン
c.	インフルエンザ菌 ペニシリン・セフェム薬, フルオロキノロン
II 性病起因菌, 食中毒菌	
1. 淋菌 セフェム薬, フルオロキノロン	
2. サルモネラ菌 [多剤耐性 <i>S. Typhimurium</i> DT104 等] セフェム, セファマイシン, カルバペネム, フルオロキノロン	
3. カンピロバクター フルオロキノロン	
III 抗酸菌	
1. 結核菌 抗結核多剤薬耐性菌 (MDR-TB)	
2. 非定抗酸菌 (非結核抗酸菌) 抗結核多剤薬耐性	

( ) わが国では治療薬として認可されていない。

(< >) わが国では治療薬として認可されておらず, 耐性菌の出現も報告されていない。

肺炎桿菌」は誰も問題としない。しかし, 生来, ペニシリンに対し高い感受性を示す肺炎球菌におけるペニシリン耐性の獲得は, 臨床的に大きな問題となっている。また, 肺炎桿菌にに対し高い抗菌活性が期待されるセフトジジムなどの第三世代

セフェム薬に耐性を獲得した肺炎桿菌の出現は, 臨床的に問題となる。1980年代から出現した, ESBL 産生菌がそれである。その他, アルベカシン耐性黄色ブドウ球菌, VCM 耐性腸球菌, カルバペネム耐性緑膿菌<sup>19)</sup>, ストレプトマイシン耐性結核

菌など、本来高い感受性が期待される抗菌薬に対し耐性を獲得した菌が、臨床的には「薬剤耐性菌」として問題となる。

## VI 問題と考えられる主な耐性菌

ペニシラーゼを産生する黄色ブドウ球菌などは、ペニシリンが使用されて間もない時期から報告されている<sup>16)</sup>が、最近では、グラム陽性球菌用の最後の命綱 (last resort) 的抗菌薬としてのVCMに耐性を獲得した腸球菌 (VRE) やアルベカシンに耐性を獲得した黄色ブドウ球菌、さらにペニシリンやアモキシシリン、さらにマクロライドに耐性を獲得した肺炎球菌などの分離が、内外で関心事となっており、一方、緑膿菌やセラチアなどのグラム陰性桿菌では、カルバペネム、ニューキノロン、アミノ配糖体など、通常、グラム陰性桿菌に有効と考えられる抗菌薬に耐性を獲得したものが、各地から分離されている。

表1に菌種別に問題と考えられる主な薬剤耐性を示す。

## VI 薬剤耐性菌の検出法の進歩

細菌検査室における耐性菌の判定は、もっぱら「薬剤感受性試験」の結果を参考に行われている。しかし、便など多種多様な細菌を含む臨床材料からのMRSAやVREの分離には、専用の分離培地が用いられることが多い。これは、通常の血液寒天培地などを用いた場合、腸内細菌などが優位に増殖し、MRSAやVREがその陰に隠れてしまい、分離の効率が低下するからである。しかし、培地の値段が1枚あたり数百円と高いなど、コストの面で解決すべき問題が残っている。また、PCR (polymerase chain reaction) 法を応用した薬剤耐性遺伝子の検出による耐性菌の判定法は、技術的には確立されたものが多い<sup>17)</sup>が、最近MRSAの検出に限って保険が適応になったのみで、その他は、コストや手間の問題で限られた施設で「研究」として実施できるのみである。

また、PCR法に依らず、2-メルカプトプロピオン酸などの阻害剤を用いた安価で簡便な検出法が、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌について開発されている<sup>18)</sup> (表2)。

表2 主な薬剤耐性菌の判定の方法

	感受性試験	選択培地	PCR	その他
グラム陽性球菌				
MRSA	◎	○	△◆	
VRE	◎	○	△	
PRSP	◎			
グラム陰性桿菌				
AmpC産生菌	◎			
ESBL産生菌	◎		△	
IMP-1産生菌	◎		△	★
その他				
BLNAR	◎			
FQs耐性菌	◎			
AGs耐性菌	◎		△	
MLs耐性菌	◎		△	

◎日常的な検査業務において一般的に用いられている。

○選択培地が市販されている。

△研究として一部で実施することができるが、一般的ではない。

◆キットが市販されている。

★2-メルカプトプロピオン酸、エチレンジアミン4酢酸 (EDTA) 等の阻害剤を用いた識別法。

BLNAR: β-lactamase-negative ampicillin resistant strains,

FQs:フルオロキノロン, AGs:アミノ配糖体, MLs:マクロライド

## VII 薬剤感受性試験を実施する際の初歩的、基本的な諸注意点

臨床分離菌が薬剤耐性菌か否かを判定するための薬剤感受性試験法は、日本化学療法学会や米国NCCLSにより、菌の培養条件、接種菌量、使用する培地、培養時間などが細かく定められている。これは、薬剤感受性試験の結果が、接種菌の培養状態、接種菌量、培地成分や種類、培養時間などの影響を受けやすく、そのような要因の影響を可能な限り排除し、一定の条件下で薬剤感受性試験を再現性を持って実施するためにさまざまな検討が行われた末に、現在のNCCLS法や日本化学療法学会の方法が定められたのである<sup>19)</sup>。

以下、薬剤耐性菌の検出・検査の際の基本的な

特集 ⑧ どうなる 21 世紀の化学療法

諸注意点を、常識的・初歩的な点も含めて概説する。

1. 薬剤感受性試験に用いる菌の継代 (passage)

感受性試験を実施しようとする菌は、検査材料から分離されて間もない新鮮な菌株(元株)を用いる必要がある。MIC 値を確定するために繰り返して感受性試験を実施する場合には、必ず、臨床材料から分離された第 1 代目の菌株を保存して「元株」とする。それを凍結保存しておき、試験の直前にその都度培養して試験に用いることが重要である。抗菌薬を含む培地上に生育した菌や抗菌薬を含有する培地で継代した株、あるいは、抗菌薬を含まない培地で継代した株を用いてはならない。

その理由は、抗菌薬を含む培地上で継代を繰り返した場合、菌の一部がその抗菌薬に対し「適応：adaptation」という現象を起こし、遺伝子の変異を伴うことなく、継代数の増加とともに、抗菌薬の標的になっている代謝経路や細菌外膜の構造などに微妙な変化が起きて、その結果 MIC 値が徐々に上昇する現象が見られるからである<sup>20)</sup>。これにより、極端な場合、数回の継代の後に 2～3 管の MIC 値の上昇が見られることもある(図 4)。

また通常では、細菌は 20～30 分に 1 回、旺盛に細胞分裂を繰り返しており、その過程で一定の頻度で遺伝子変異を自発的に発生している。そこで、感受性試験の際に抗菌薬が存在することにより、抗菌薬に適応した遺伝子変異株が出現・選択され、本来の臨床材料に含まれなかった、「耐性菌」が人為的に作成され分離されてくることがある。例えば、フルオロキノロン耐性菌などは、頻度は低い ( $10^{-8}$  以下) が感受性試験の過程で出現する<sup>21)</sup> 場合もあり、細心の注意が必要である。

一方、プラスミド上に耐性遺伝子を持つ菌株では、保存状態が悪かったり、抗菌薬を含まない培地で継代培養すると、プラスミドが脱落し、「感受性化」する現象がしばしば発生する。例えば、*vanA* 型 VRE の標準株として配布された株が、その保存状態が悪かったためか、いくつかの株においてプラスミドが脱落し、遺伝子が陰性になってしまうという「事件」が最近、国内で話題となった。したがって、「元株」は  $-80^{\circ}\text{C}$  またはそれに準ず

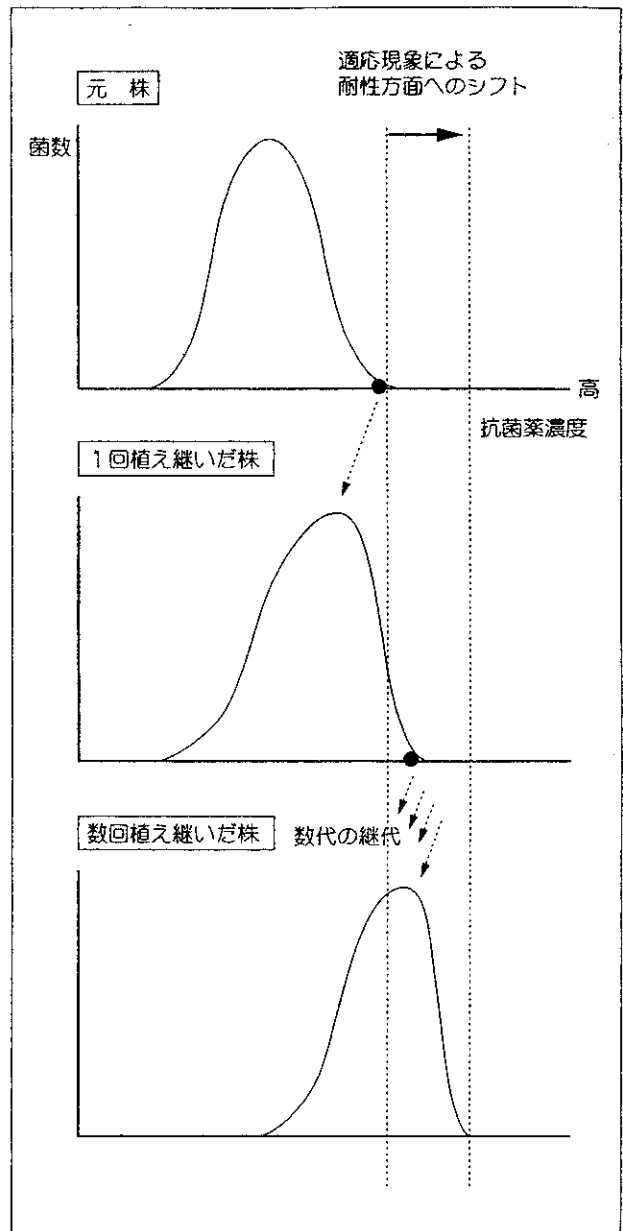


図 4 抗菌薬の入った培地で植え継ぐ事による感受性分布のシフト

抗菌薬を含む培地上で継代を繰り返した場合、菌の一部がその抗菌薬に対し「適応：adaptation」という現象を起こし、遺伝子の変異を伴うことなく、継代数の増加とともに、抗菌薬の標的になっている代謝経路や細菌外膜の構造などに微妙な変化が起きて、その結果 MIC 値が徐々に上昇する現象が見られる。

る方法で保存し、使用前に  $1/4$  MIC 程度の濃度の抗菌薬を含む培地に接種して耐性度を確認する必要がある。ただし、前培養する培地中の抗菌薬の濃度が  $1/2$  MIC 以上の場合、感受性結果に影響することがあるので注意が必要である。

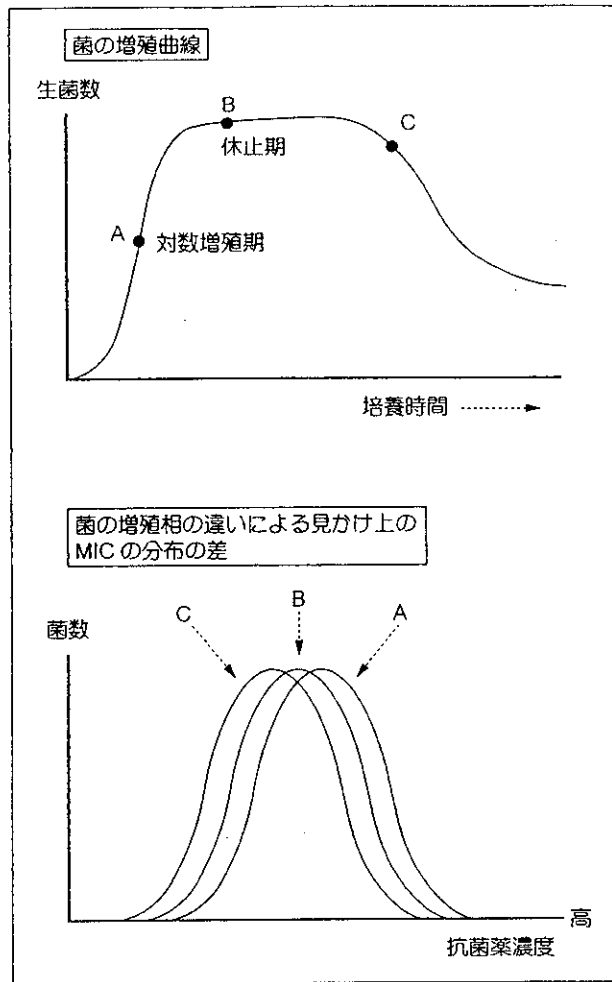


図5 試験菌の増殖相の違いによる感受性分布のシフト現象

対数増殖期 (log phase) の菌と休止期 (stationary phase) の菌を用いた場合には、感受性結果に微妙な差が見られることが多い。

## 2. 接種する菌の培養状態

菌を新鮮な培地に接種すると、時間の経過とともにS状曲線を描いて増殖する。対数増殖期 (log phase) の菌と休止期 (stationary phase) の菌を用いた場合には、感受性結果に微妙な差が見られることが多い(図5)。活発に分裂・増殖している対数増殖期の菌の方が、休止期の菌より、抗菌薬のMIC値が高くなるものが多いが、ペニシリンなどのβ-ラクタム薬では、逆に菌が旺盛に分裂・増殖している時期に強く殺菌作用を発揮するため、それが、MIC値に影響する場合もある。

## 3. 接種する菌量

接種する菌量を多くすることにより、MIC値が

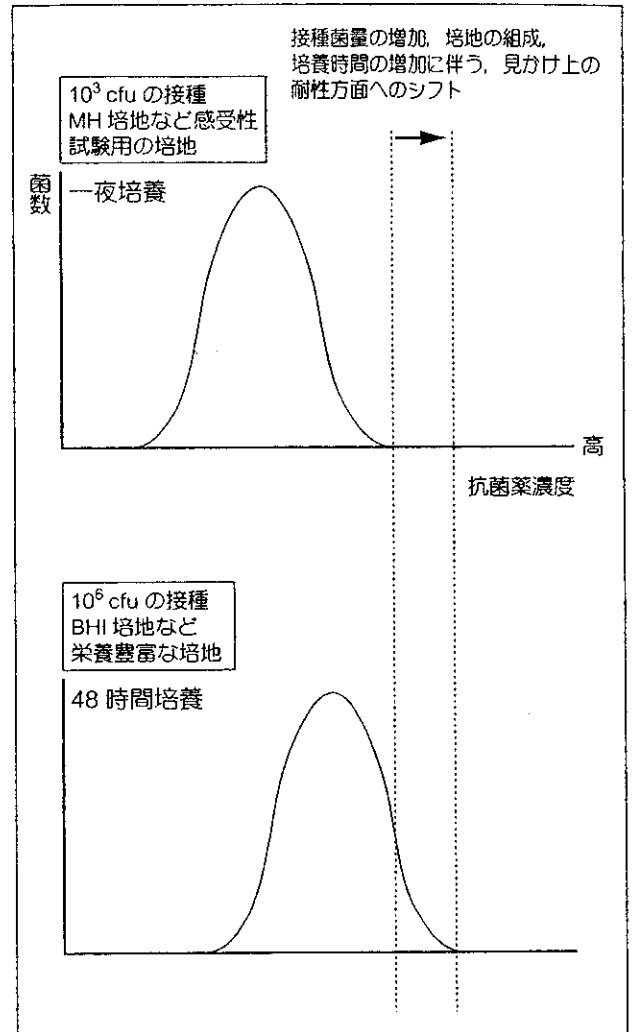


図6 Inoculum effect, 培地の組成, 培養時間などによる感受性分布のシフト

感受性試験の際の接種菌量には、十分な注意が必要となっている。ちなみに、10～100倍の菌量を接種すると、MIC値が1～2管程上昇することが多い。栄養豊富な培地を用いた場合の方が菌の生育が促進され見かけ上MIC値が上昇することも良く知られていることである。培養時間が長くなれば、培地中の抗菌薬は分解・拡散し力価の低下は避けられず、見かけ上、MIC値が上昇する事もまたよく知られていることである。

高くなることは、「inoculum effect」として、一般的に良く知られている「通則」である<sup>20)</sup>。したがって感受性試験の際の接種菌量には、十分な注意が必要となっている。ちなみに、10～100倍の菌量を接種すると、MIC値が1～2管程上昇する事が多い(図6)。

## 4. 培地の組成や種類

栄養豊富な培地を用いた場合の方が菌の生育が



## 特集◎どうなる 21 世紀の化学療法

促進され見かけ上 MIC 値が上昇することも良く知られていることである<sup>23)</sup>。例えば、栄養豊富なブレインハートインフュージョン (BHI) 培地や、ブルセラ培地などで得られた結果は、感受性試験用の培地である Mueller-Hinton 培地を用いて得られた結果と比べた場合、多くの抗菌薬において 1~2 管高い MIC 値を示すことが普通である (図 6)。しかも、BHI 培地などは、感受性試験用の培地として精度管理がされているわけではないので、同じメーカーの製品であっても、ロットの異なる培地を用いて感受性試験を行った場合、その結果が「バラツク」ことは避けられず、ましてや、製造メーカーが異なっている際にはなおさらのこと、そのような栄養豊富な培地を用いた「感受性試験結果」をもとに感受性を論じたり、その結果を他の研究グループの試験結果と比較検討することは、無意味なことである。

## 5. 培養時間, 温度

培養時間が長くなれば、培地中の抗菌薬は分解・拡散し力価の低下は避けられず、見かけ上、MIC 値が上昇することもまたよく知られていることである (図 6)。アミノ配糖体系は比較的安定であるが、テトラサイクリン系、クロラムフェニコール、 $\beta$ -ラクタム薬などは短期間に力価が低下するものも多い。したがって、増殖が遅い特定の細菌以外は、通常、一夜あるいは 18 時間程度の培養で感受性試験結果が判定される。黄色ブドウ球菌や腸内細菌など増殖の早い菌を、48 時間以上培養した場合、特に VCM やクロラムフェニコールなどのような静菌的作用を示す抗菌薬では、コロニーの生育を見ることが多い。しかしながら、その場合は、検査材料中に「slow growing」の「耐性菌」が潜在しているということよりは、一般的には培地中の抗菌薬の力価の低下とも相まって「適応現象」として、コロニーが生育したと考えることの方が優先する。ただし、このように遅れて発育してきた細菌を調べるには、次の章で述べる留意も必要である。

その他、当然であるが、培養温度、培地の乾燥状態なども微妙に感受性試験結果に影響するので注意を要する。

## 6. 感受性判定時の注意点

一定の菌量を培地に接種した場合、寒天平板希釈法などでは、ある抗菌薬の濃度において、接種部位に独立したコロニーが、1~数個出現することがある (図 7)。その場合、それらが、微量に混在する耐性菌によるものか、それとともに、「バラツキ現象」による偶然の産物か、判別が必要となる。その場合、そのコロニーを採り、適当な液体培地で希釈し、再度、抗菌薬を含まない培地に塗布して培養し、生育した複数のコロニーについて感受性検査を行い、その感受性分布の状態により偶然生育したコロニーなのか、安定した耐性形質を示す菌なのかを識別することが肝要である (図 8)。偶然生育したコロニーの場合は、感受性のところに分布の中心が来るが、「耐性菌」の場合は、元の値を中心とした分布が見られる。ただし、この際においても、感受性試験の過程で発生した「遺伝子変異株」を選択している可能性を確かめるため、臨床材料や「元株」について、再現性を確認する必要がある。

## Ⅷ 耐性菌の検出をめぐる若干の問題点

## 1. 分離・検出や判定が難しい耐性菌

VRE や ESBL 産生肺炎桿菌などのように、わが国ではまだ稀にしか分離されていない細菌が検出された際には、その同定には慎重さを要する。しかも最終的には遺伝子の解析が必要なことも生ずるため、一般の医療機関の細菌検査室での日常業務の中で判定することが困難な場合もある。また、各地から分離されている、IMP-1 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを産生するセラチアや緑膿菌なども、AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼを産生するセフェム薬耐性菌との鑑別が難しい場合が多い。このことに関して、最近、VCM に「ヘテロ耐性」や「ホモ耐性」を獲得した MRSA がわが国で「分離」され<sup>24)</sup>、世界的に話題を提供していることについて若干の知見を述べることにする。

## 2. 「バンコマイシン耐性 MRSA」出現の衝撃と波紋

1997 年に、日本において、VCM に「ヘテロ耐性」や「ホモ耐性」を示す MRSA が分離されたとの研究結果が Lancet などに報告され<sup>24)</sup>、国内の臨床家のみならず、国際的にも世界保健機構

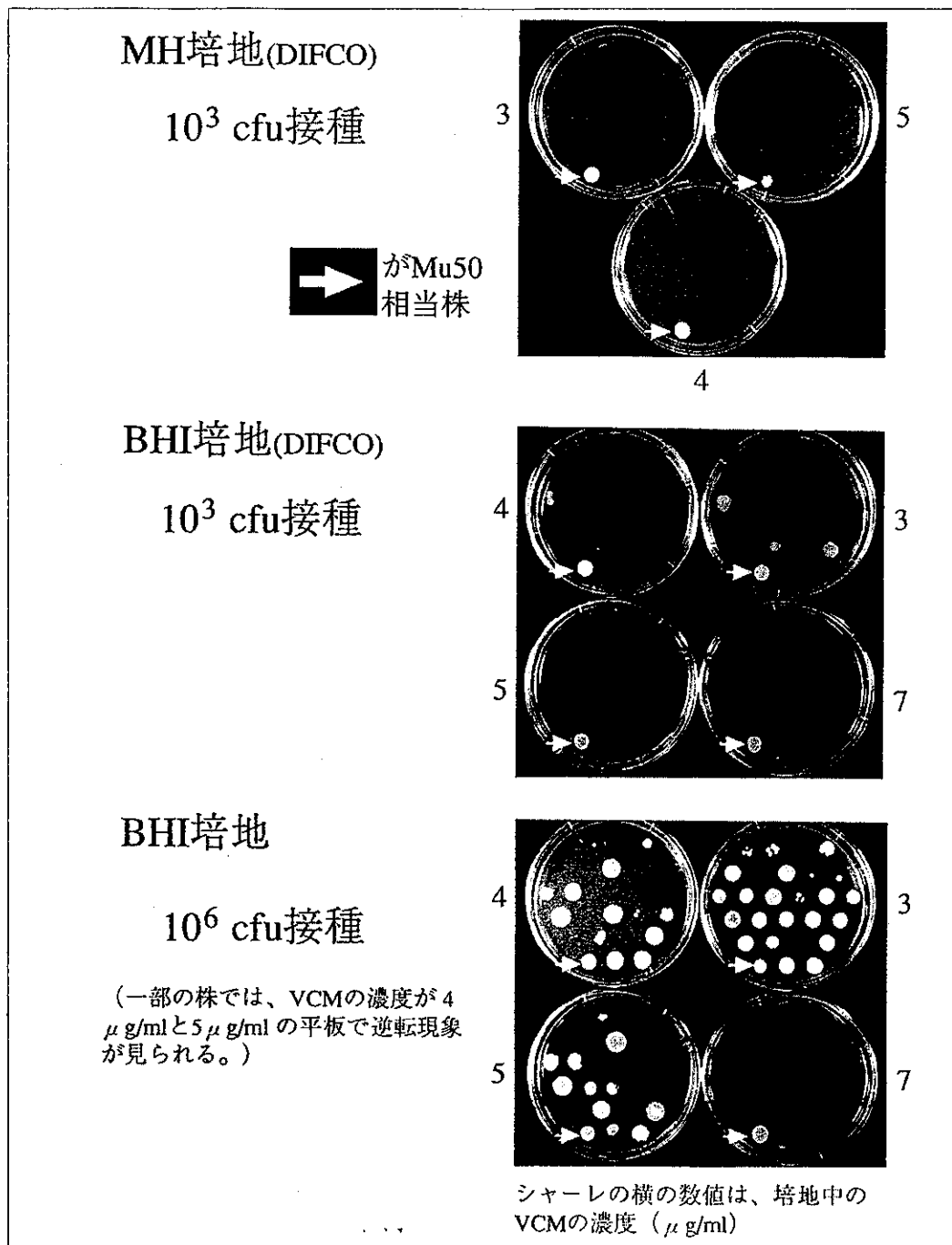


図7 寒天平板希釈法における、接種菌量、培地の種類の影響

MH 寒天培地を用いた場合、1,000 cfu 程度の菌量の接種でも、Mu50 株に相当する GISA 株 (ミシガン州分離株) では、VCM の濃度が  $5 \mu\text{g/ml}$  の培地上にコロニーが形成され、VCM の MIC は  $8 \mu\text{g/ml}$  と判定されるが、1997 年に国内で臨床分離された 6,625 株の MRSA の中にはこれに相当する株は、確認されなかった。(図上)。その結果、Mu50 に相当する「VRSA」や GISA に相当する株が出現した場合には、MH 寒天培地などを用いた現行の薬剤感受性試験によりそれらの検出が可能と考えられる。

BHI 寒天培地を用いた場合、1,000 cfu 程度の菌量を接種すると、Mu50 株に相当する GISA 株は、VCM の濃度が  $7 \mu\text{g/ml}$  の培地上にコロニーが安定して形成されたが、国内で臨床分離された 6,625 株の MRSA の中にはこれに相当する株は、最終的に確認されなかった。(図中)。

BHI 寒天培地に、1,000,000 cfu 程度の菌量を接種した場合、Mu50 株に相当する GISA 株では、VCM の濃度が  $7 \mu\text{g/ml}$  の培地上にコロニーが安定して形成されたが、国内で臨床分離された 6,625 株の MRSA の中にはこれに相当する株は、最終的に確認されなかった。(図下)。

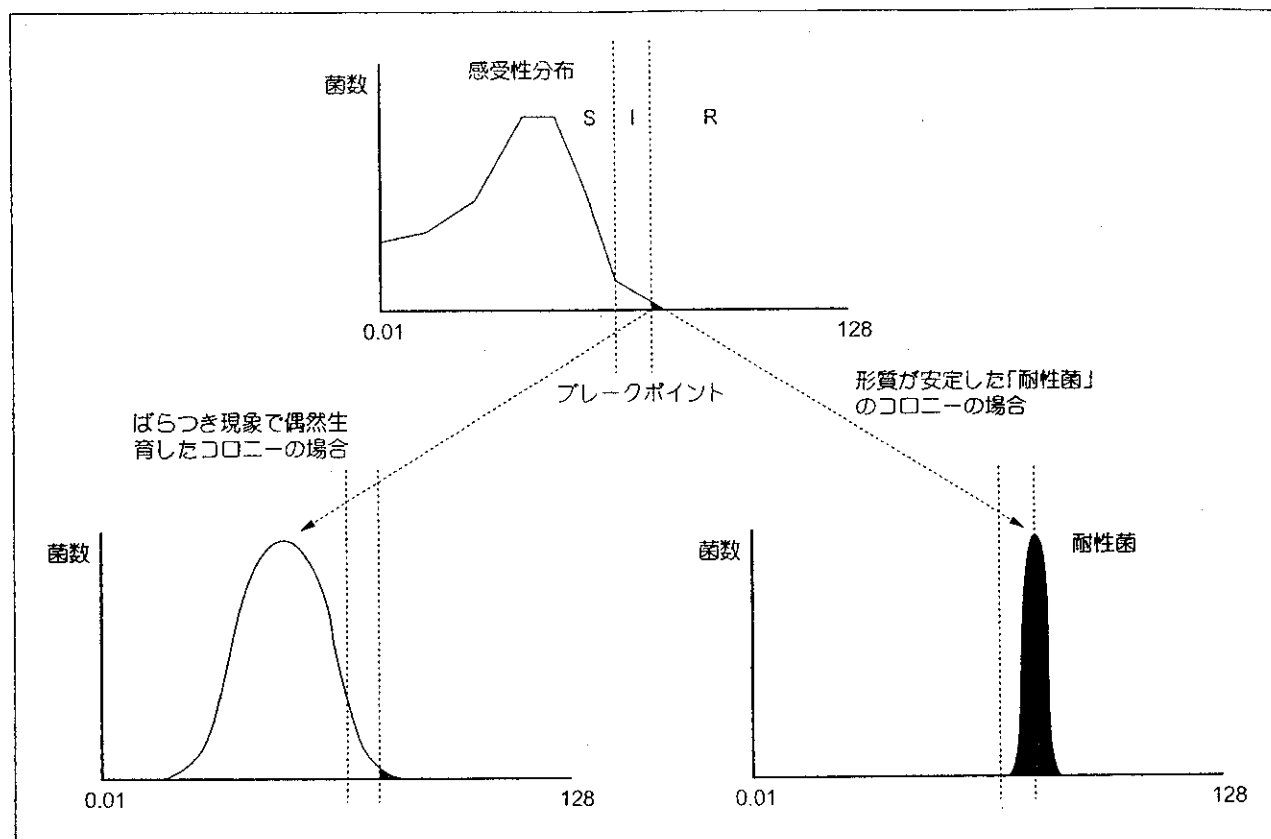


図8 ブレイクポイント付近で生育したコロニーが安定した形質を示す耐性菌によるものか否かを推定する方法  
コロニーを採り、適当な液体培地で希釈し、再度、抗菌薬を含まない培地に塗布して培養し、生育した複数のコロニーについて感受性検査を行い、その感受性分布の状態により偶然生育したコロニーなのか、安定した耐性形質を示す菌なのかを識別することが肝要である。

(WHO) や米国疾病対策センター (CDC) を巻き込んで大きな衝撃をもって受け止められた<sup>25)</sup>。その背景としては、欧米では、MRSA などのグラム陽性球菌による感染症の治療薬として、VCM が長らく使用されてきたが、特に最近ではこれらに対し有効な抗菌薬が乏しくなる中で、VCM は「最後の命綱 (last resort) 的抗菌薬」として用いられており<sup>26)</sup>、それに対する耐性菌の出現は、医療にとって大きな脅威と考えられていたことがあげられる。特に、有効な抗菌薬が乏しい MRSA における VCM 耐性菌の出現は、欧米の医療現場で深刻な事態を引き起こすため、CDC は 1995 年に「Recommendation for preventing the spread of vancomycin resistance. MMWR 44 (RR-12) : 1-13 (1995)」を公表し、VCM 耐性菌の出現に対する警戒を呼びかけていた。その矢先での、日本での「VCM 耐性 MRSA : VRSA」の出現という Lancet の報に、大きな反響が寄せられたのは当然であっ

た。

### 3. 「バンコマイシンヘテロ耐性 MRSA」と「バンコマイシンホモ耐性 MRSA」

「VCM 耐性 MRSA : VRSA」の出現に対して、大きな関心が寄せられた理由はいくつか有るが、その 1 つに、Lancet の研究報告の中に「VCM ヘテロ耐性 MRSA」が、既に日本の臨床現場に広く拡散してしまっており、それが、VCM による治療の失敗の原因となっている。しかし、現在、日常的に細菌検査室で行われている薬剤感受性試験法 (NCCLS 法など) によってそれらを検出することはできない (要約) という指摘があったからである。換言すると、「ヘテロ耐性 MRSA (Mu3 株)」は、一定の菌量について感受性のポピュレーションを測定した場合、10 ~ 100 万個の細菌細胞の中に 1 個程度の割合で、VCM の MIC 値が 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示す「VCM ホモ耐性 MRSA (VRSA : Mu50 株に相当)」が最初から含まれている。そのような

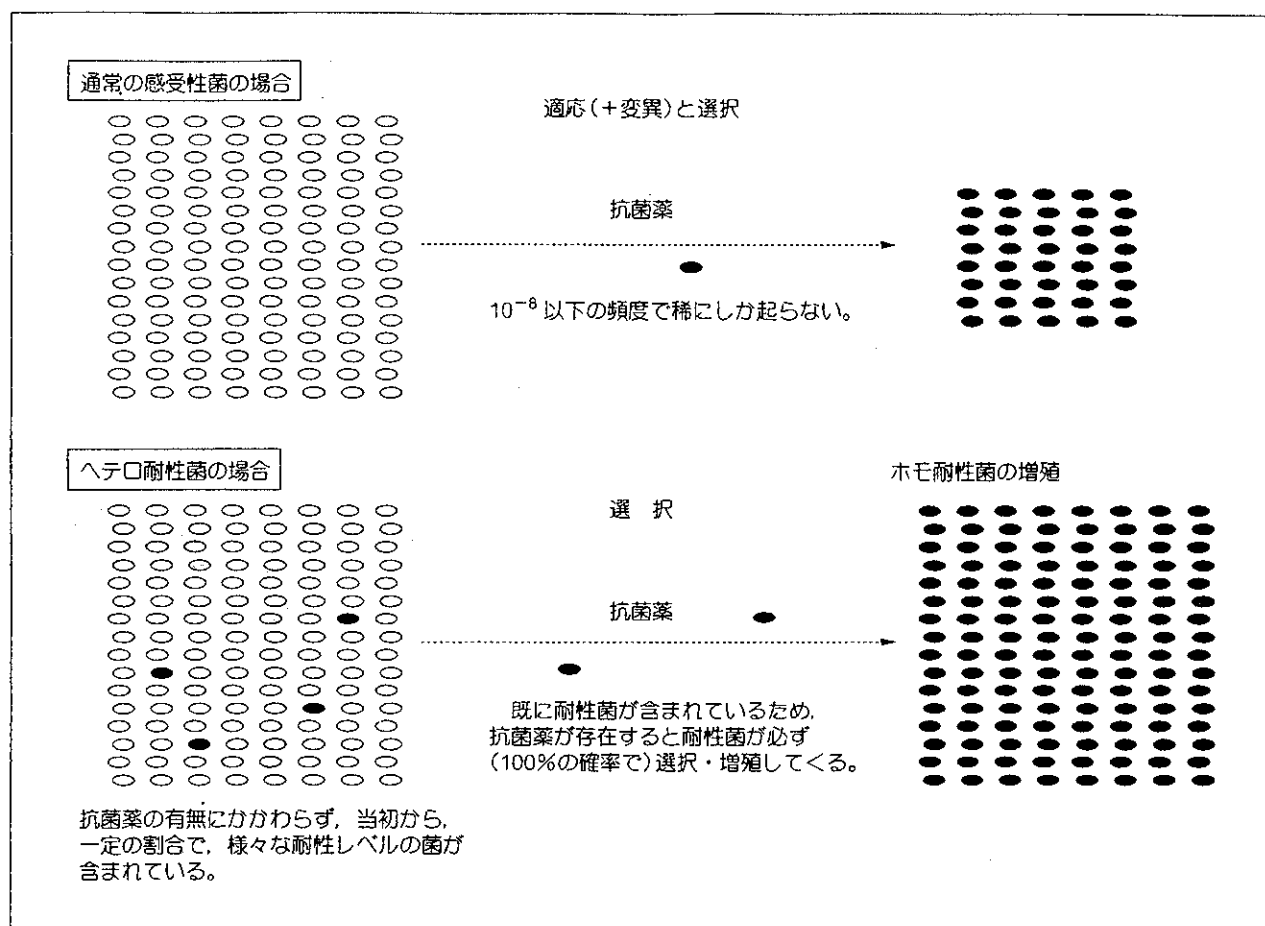


図9 ヘテロ耐性菌が問題とされる理由

通常の細菌の場合、抗菌薬に暴露されると、適応現象や耐性遺伝子の誘導現象などにより一定の頻度で、耐性度が上昇する株 (variant) が出現する。また、何らかの遺伝子の変異を伴う耐性菌が出現する頻度は、10のマイナス8乗以下であり稀である (図上)。

一方、Lancetに報告されたような「VCMヘテロ耐性菌」が仮に存在した場合、その中に、10万～100万個に1個程度の割合で、VCMのMICが8 µg/mL以上と判定される「VCMホモ耐性菌 (Mu50株に相当)」が必ず含まれるため、10万個以上の菌数の「VCMヘテロ耐性菌」が存在した場合、VCMの投与により「VCMホモ耐性菌」が、100%の高率で出現してくることになる。したがって、「VCMヘテロ耐性菌」の存在は、医療にとって大きな脅威となるため、米国CDCは、この問題を公衆衛生上大きな問題としてとらえ、この種の株が分離された場合には、各州の保健当局やCDCに報告するように、全米の医療機関に注意を喚起した。

「VCMヘテロ耐性菌」が感染した患者にVCMを投与すると、その中に含まれるVRSAが選択され、生き残って増殖するため (図9)、患者の感染部位からMRSAが除菌されず、その結果VCMによる治療失敗の原因となるということである。さらには、「 $10^3$  cfu (colony forming unit) 程度の菌数しか接種していない現行の感受性試験法では、 $10^5 \sim 10^6$ に1個程度しか存在しない【VRSA】を検出することが出来ない。」ということがその論文には記載されていた。このため、米国CDCも「こ

れは一大事だ！」として、緊急の対応となったのであった。

#### 4. わが国における調査結果

そこで、もしこの報告が事実であれば、わが国においては臨床的に大きな脅威となる。そのため、厚生省は1997年の年末に、厚生科学特別研究事業として(社)日本臨床衛生検査技師会の微生物研究班の協力により、急遽全国245の医療施設から6,625株のMRSAを分離・収集し、VCMに対する感受性調査が実施された。

## 特集◎どうなる 21 世紀の化学療法

そして、Lancet で紹介された上述の論文の方法に従い、前培養した菌を、VCM を  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  含む BHI 寒天培地に  $1,000,000 \text{ cfu}$  程度の過量の菌を接種した際に、たしかに、全体の  $3 \sim 4\%$  の株においては、論文に記載されているようにコロニーの発生が見られた。しかし、そのようなコロニーの発生が見られた菌株について、再度の実験をしても、その再現性に乏しく、しかも、その中に、「VCM ホモ耐性 MRSA」とされる VRSA 株 (Mu50 株に相当する株) と同様な株、あるいは、VCM に  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の MIC (NCCLS 法) を示す株は確認できなかった<sup>27)</sup>。図 7 は、VCM を  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  含む BHI 寒天培地にコロニーを発生した株の中から、再度、日本化学療法学会の標準法に従って、VCM の MIC を測定し、その値が  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  と「判定」された株等を抽出し、再々試験を行ったものである。つまり、図 7 の下段に示すように、BHI 寒天培地に  $10^6 \text{ cfu}$  の過大な菌量を接種した場合には、VCM の含有濃度が  $4 \sim 5 \mu\text{g}/\text{mL}$  の培地で、一部の株で再度のコロニーの発生が見られているが、 $10^3 \text{ cfu}$  の菌量の接種では、Mu50 株を除く、全ての株が、VCM を  $3 \mu\text{g}/\text{mL}$  含む NH 培地 (図 7 上段) に生育することができなかった。

VCM を  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  含む BHI 寒天培地にコロニーを発生する、「ヘテロ耐性菌」からは、Lancet に記載された論文によれば、Mu50 に相当する「ホモ耐性菌: VRSA」が、必ず分離されてくるはずである。そのことを確認するため、これらの菌株について、分離・検出を繰り返し試みたが、結果的には、それらを確認することが出来なかった。この事実から、VCM を  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  含む BHI 寒天培地にコロニーを発生する株の出現は、「ヘテロ耐性菌」の存在を反映しているのではなく、接種菌量や培地の成分などの複合的影響により、コロニーが偶然生育する現象の一端を捕えているに過ぎないことが強く示唆された。

## 5. 「VISA」の臨床的評価

VCM を  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  含む BHI 寒天培地に過剰量の菌を接種した場合「コロニーを発生しやすい」株が一定の割合で存在すること自体は、Lancet の論文に記載されたようであり、否定するものではない。これまでに内外で報告されている「VISA」は、

主として 1 カ月以上の長期間にわたって、VCM を投与され続けた患者からのものであり、「*in vitro*」で出現する現象が、「*in vivo*」でも起ったとしても、驚くに値しないが、さらに、重要なことは、それらが、周囲の患者に伝播して「院内感染」を引き起こしたか否かということである。しかしながら、そのような報告はされていない。そのような菌を敢えて「VCM 低感受性 MRSA」と呼ぶ必要があるのなら、それはそれとして認められることであるけれども、それらの菌株は、通常の NCCLS 法で試験すると VCM の MIC 値は、全て  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$  以下 (その大半は  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  以下) なり、その意味においても VCM の MIC 値が  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  とされる Mu50 株とは質的に異なるものと考えられる。また、それらの菌株を敢えて、「VCM 低感受性 MRSA (VISA)」として、通常の VCM 感受性 MRSA と区別する必要があると主張するためには、このレベルの「VCM 低感受性 MRSA」による感染症患者の予後が、通常の MRSA による感染症患者のそれより有意に悪いという evidence が必要である。つまり、これらの株を敢えて「VCM 低感受性 MRSA」と区別して呼ぶ前に、その臨床的な評価が先行されるべきであった。

現状の MRSA 感染症の臨床経過においては、菌が産生する毒素産生性や侵襲性といった要因の方が臨床経過により大きく関与しており、それに比較して「VCM 低感受性」であるということが大きな要因となっているという臨床報告は今のところ見当たらない。筆者らは、名古屋大学医学部附属病院において、1995 年～1997 年の間に、MRSA による感染症で死亡したと考えられる 23 名の患者から分離された MRSA を調査した結果、その中に「VISA」が有意に高く存在するという事実は確認できなかった<sup>27)</sup>。

## 6. 真の VRSA の出現への警戒

たしかに、VCM は感染病巣や気道内への移行性が悪い抗菌薬であるので、MRSA に対する VCM のブレイクポイントを再検討することは必要かもしれない。しかし、それと、「VISA」や「VRSA」が存在するか否かという問題は、些か次元の異なる問題である。たしかに、近い将来 VRE のような外来性に *vanA*, *vanB* などの耐性遺伝子

クラスターに類似した耐性機構を獲得した VRSA が出現する可能性は十分ありうることである。そのような VCM に対する MIC 値が 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  あるいはそれ以上の MIC 値を示す VRSA (Mu50 を含む) が出現した際には、VCM を大量に使用している患者においても VCM の血中濃度等の体内動態の推移からは、患者の感染部位において選択され優位となって検出されるはずであり、それらは、VCM を 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  含む MH 培地を用いた現行の薬剤感受性試験法によって十分検出することが可能である (図 7)。したがって、VCM を投与されている患者から分離される MRSA について、これまでと同様に NCCLS 法や日本化学療法学会の方法に従い、薬剤感受性試験を実施することで、VCM の MIC 値が 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上を示す VRSA の早期検出は十分可能であると考えられる。

なお、欧米の論文を読む限り、現時点では、VCM の MIC 値が 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とされる株は「VISA」と表現される事は多いが、それを「VRSA」と呼んでいる研究報告は見当たらないことも留意する必要がある。

#### 7. 検査室における「VISA や VRSA」の検出

以上述べたように、臨床的に VCM の MIC 値が  $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるような VRSA が出現した場合、現行の NCCLS の方法によっても、それらを検出することは可能である。そのことを考慮すれば、現時点では、一般の細菌検査室の日常の業務の中で、この種の「VCM 低感受性」や「VCM ヘテロ耐性」という不安定かつあいまいな属性を示す MRSA を、Lancet で紹介されているような特殊な検査法や選択培地を用いて鋭意検出しなければならない事態に立ち至っているとは考え難い。しかし、ブドウ球菌属は、人為的にグライコペプチドを含む培地でしつこく継代することにより、やや高い濃度に生育しやすくなった株が出現することは、既によく知られた事実であり<sup>28,29)</sup>、感受性検査の際に考慮しなければならないことが指摘されている<sup>29)</sup>。そのような株では、ペプチドグリカン (PG) の生合成が亢進し、PG 層が肥厚しているなどの報告がある<sup>30)</sup>が、その遺伝学的メカニズムは不明である。したがって、このような不安定かつあいまいな属性を示す菌におけるメカニズ

ムを究明することは必要なことで、それは、ブドウ球菌属におけるペプチドグリカンの生合成機構や、VCM の作用機構をより詳しく解明することに貢献するかも知れない。

#### IX おわりに

VRE や ESBL 産生菌、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌など、国内ではいまだ稀にしか分離されない耐性菌については、検査室における分離法や判定法の一層の技術的向上をはからねばならないことは事実である。

しかしながら、〔VCM 耐性黄色ブドウ球菌〕を検出するため、BHI 培地に過量の菌を接種する〔特殊な検出法〕を用いた検査法が今すぐ必要であるとは考え難い〕という論点について述べてきた。ことに黄色ブドウ球菌のように強い増殖力と、BHI 培地に含まれる豊富な栄養との間にもし出される環境が、VCM の「静菌的抗菌活性」との間に微妙な拮抗的な現象を示すことは十分に考え得ることである。このような要因が加わることにより、菌が生育できる限界付近の VCM 濃度において、コロニーが不特定に散発して発生し、その結果にかなりの「バラツキ」が発生すると考えるのが現状においては妥当なようである。最近、Aeschlimann らも米国ミシガン州で分離された「VISA」や Mu50 について詳細な解析を行い、Hiramatsu らが Lancet で報告した結果と大きく異なる結果が得られたことを報告している<sup>29)</sup>。

筆者らのこれまでの調査では、VCM の MIC 値が 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (NCCLS 法) である Mu50 株に相当する「VCM ホモ耐性 MRSA (VRSA)」を一定の割合で含有する「VCM ヘテロ耐性 MRSA」が、国内の医療施設に広く蔓延しているという Hiramatsu らの報告<sup>29)</sup>を再確認することはできなかった。また最近、米国 CDC の Tenover F.C. らのグループは、米国内での MRSA の調査結果を報告し、前述した筆者らの見解と同様の結論に達している<sup>31)</sup>。しかし、VRE のように、*van* 遺伝子クラスターの如き耐性機構が明らかな VRSA が、近い将来、国内のどこかで出現する可能性は否定できない。したがって、グラム陽性球菌属における VCM および テイコプラニンなどのグリコペプチド系抗菌薬

## 特集◎ とうなる 21 世紀の化学療法

(GPs) に対する感受性動向の監視を日常的に強化しつつ、一方で、臨床現場における GPs の適正使用に一層心掛けることが強く求められていると言えよう。

## 文 献

- 1) 紺野昌俊ほか：全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究. 感染症学雑誌 68 : 1338-1351 (1994)
- 2) Fujita N., et al : First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. Antimicrob Agents Chemother 42 : 2150 (1998)
- 3) 今福裕司ほか：vanB 型 VRE による子宮頸癌術後骨盤内感染性嚢胞の 1 例. 感染症学雑誌 73 : 473-476 (1999)
- 4) 抗生物質感受性状況調査報告. (財)医療情報システム開発センター, 東京, (1993) ~ (1997)
- 5) NCCLS : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing : ninth informational supplement. 19 (1) : M100-S9 (1999)
- 6) 荒川宜親：薬剤耐性獲得のメカニズムと耐性菌対策. Medical Practice 14 : 1534-1549 (1997)
- 7) Fournier B., et al. : Point mutation in the pribnow box, the molecular basis of  $\beta$ -lactamase overproduction in *Klebsiella oxytoca*. Antimicrob Agents Chemother 39 : 1365-1368 (1995)
- 8) Honore N., et al. : Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. EMBO J 5 : 3709-3714 (1986)
- 9) Campbell J.I., et al. : *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis have different  $\beta$ -lactamase expression phenotypes but are homogeneous in the *ampC-ampR* genetic region. Antimicrob Agents Chemother 41 : 1380-1384 (1997)
- 10) Swanberg S.L., et al. : Cloning and sequencing of the *Escherichia coli gyrA* gene coding for the A subunit of DNA gyrase. J Mol Biol 197 : 729-736 (1987)
- 11) Vila J., et al. : Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 40 : 491-493 (1996)
- 12) Philippon A., et al. : Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13 (Suppl. 1) : S17-S29 (1994)
- 13) 紺野昌俊, 生方公子 : 改訂・ペニシリン耐性肺炎球菌. ペニシリン耐性肺炎球菌研究会編, (株)協和企画通信, 東京 (1999)
- 14) Heaton M.P., et al. : Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a *VanA* plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. Gene 171 : 9-17 (1996)
- 15) Senda K., et al. : Multifocal outbreaks of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams, including carbapenems. Antimicrob Agents Chemother 40 : 349-353 (1996)
- 16) Abraham E.P., Chain E. : An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 146 : 837 (1940)
- 17) Senda K., et al. : PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (*blaIMP*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. J Clin Microbiol 34 : 2909-2913 (1996)
- 18) Arakawa Y., et al. : A convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase producing gram-negative bacteria by using thiole compounds. J Clin Microbiol 38 : (in press)
- 19) 河喜田龍祥 : 薬剤感受性検査. 近代出版, 東京 (1987)
- 20) Buscher K.H., et al. : Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. Antimicrob Agents Chemother 31 : 703-708 (1987)
- 21) Stobberingh E.E., et al. : *In vitro* evaluation of Ro 23-6240, a new fluorinated 4-quinolone. Chemotherapy 33 : 197-203 (1987)
- 22) Greenwood D., et al. : A comparison of the responses of *staphylococci* and *streptococci* to teicoplanin and vancomycin. J Antimicrob Chemother 20 : 155-164 (1987)
- 23) Linzenmeier G., et al. : *In vitro* susceptibility of clinically important bacteria to amikacin : correlation of results of broth dilution and disk sensitivity tests and effect of medium composition. J Infect Dis 134 (suppl) : S262-S270 (1976)

- 24) Hiramatsu K., et al. : Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350 (9092) : 1670-1673 (1997)
- 25) Tenover F.C., et al. : Characterization of *staphylococci* with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 36 : 1020-1027 (1998)
- 26) Moellering R.C., Jr. : The specter of glycopeptide resistance : current trends and future considerations. *Am J Med* 104 (5A) : S3-S6 (1998)
- 27) 荒川宜親ほか : 平成9年度厚生科学特別研究事業「我が国におけるバンコマイシン低感受性MRSA等の実態に関する緊急調査」報告書。(1997)
- 28) Sieradzki K., et al. : Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 179 : 2557-2566 (1997)
- 29) Aeschlimann J.R., et al. : Analysis of vancomycin population susceptibility profiles, killing activity, and postantibiotic effect against vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 43 : 1914-1918 (1999)
- 30) Sanyal D., et al. : An electronmicroscope study of glycopeptide antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 39 : 204-210 (1993)
- 31) Hubert S.K., et al. : Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* : evaluation of a novel screening method and results of a surgery of selected U.S. hospital. *J Clin Microbiol* 37 : 3590-3593 (1999)

#### 栄研化学(株)／新規HCVコア抗原検査薬の商品化

栄研化学(株)は(株)先端生命科学研究所と提携し、新規のC型肝炎ウイルス(HCV)のコア抗原を化学発光酵素免疫法で検出する検査薬の商品化をすすめていることを発表した。

C型肝炎はわが国の慢性肝炎の70～80%を占め、20～30年の病期を経て、肝硬変、肝癌へと高率に移行し、わが国における肝細胞癌の約75%がHCVに起因すると報告されている。

C型肝炎の診断には、ウイルスマーカーの検査として、HCV抗体の測定、PCR法、b-DNA法によるHCV-RNA量、及びHCVコア抗原の測定が行われている。しかし、HCV抗体は簡便に測定できることからスクリーニング検査に広く利用されているが、感染初期には陽性にならず、また、必ずしも血液中のウイルス量を反映しないことから、精密診断や薬物治療の効果判定には適していない。

したがって現在、精密診断には、HCV-RNA量の測定が行われているが、現行法は高度の技術を要し、且つ試薬コストが高いため、より簡便な測定法の開発が望まれている。

栄研化学(株)が商品化を進めている検査法は、PCR法に匹敵する感度を有し、簡便で且つ試薬コストの低減も見込めるため、C型肝炎のスクリーニングから精密診断、病態のモニターまで広く利用できるものだ  
(編集部)



## 2 診断・治療と遺伝子検査 薬剤耐性遺伝子の検出

# ESBLs 遺伝子の検出法

YAGI TETSUYA/KUROKAWA HIROSHI/SHIBATA NAOHIRO/ARAKAWA YOSHICHIKA

八木哲也/黒川博史/柴田尚宏/荒川宜親

●国立感染症研究所細菌・血液製剤部

### はじめに

ESBLs 遺伝子を検出する最も確実な方法は、やはり PCR 法であると思われる。しかし ESBLs の範疇にはいる  $\beta$ -ラクタマーゼは数多くの種類のもので報告されており、そのすべての種類の ESBLs に対するプライマーを作成し、臨床分離された耐性菌について PCR を行うのは実用的ではない。PCR をかける前に、①ESBLs の概念とわが国での分離状況を理解し、②適切なスクリーニングを行い、ESBL 産生が疑われる菌株を絞り込むことが重要と考えられる。本年 1 月に NCCLS の Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing の第 9 版の増補版<sup>1</sup>が出版され tentative な ESBL 検出法が提示されているが、わが国にそのまま適用した場合、いくつかの問題点が生じる。また、PCR 検査は保険適用になっておらず、実施できる施設も限られているという問題もあるため、PCR を行わないで ESBL の genotype をある程度判定できれば有用である。本稿では NCCLS の方法に加え、われわれの用いている方法を紹介するとともに、わが国の ESBL 産生菌の現状に即した ESBLs 遺伝子の検出法について考察したい。

### 1 ESBLs とは何か

$\beta$ -ラクタマーゼの分類には、その分子構造の違いによる Ambler の分類<sup>2</sup>や、最近では Bush らの機能分類<sup>3</sup>がある。ESBLs は前者の分類では class A または class D に、後者では group 2b または 2d に属する酵素群であり、class C (group 1) や class B (group 3) に属するものは含まない。その特徴は、cefotaxime や ceftazidime のようなオキシイミノ系  $\beta$ -ラクタム剤や, aztreonam のようなモノバクタム系  $\beta$ -ラクタム剤を効率よく分解し、一般にその酵素活性は clavulanic acid などの  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤によって阻害を受け、セファマイシン系の  $\beta$ -ラクタム剤やカルバペネムは分解できないというものである。欧米で報告が多く疫学的にも重要視されているのは、TEM 型、SHV 型、OXA 型と呼ばれる基質特異性の狭いプロトタイプがあり、それにいくつかのアミノ酸変異が加わって基質特異性が広がった  $\beta$ -ラクタマーゼであり、欧米ではこれらが ESBL と同義語のように使用されている感がある。しかし欧米のこうした状況をそのままわが国に適用すると、以下に述べるようなことから混乱を生じることになる。

## 2 わが国でのESBLsの分離状況

黒川らが1994年9月から1995年8月にかけて行った調査において、ceftazidimeに耐性を示す株が *Klebsiella pneumoniae* 16,915株中41株、*Escherichia coli* 23,568株中30株で見られることが明らかになった<sup>4)</sup>。これらの菌株の種々のβ-ラクタム剤に対する感受性パターンはさまざまで、この時点では薬剤耐性機序は不明であった。1997年1月から1998年1月にかけて関東、東海地方の196施設(病床数300以下の中小規模の病院と外来診療のみの開業医療施設が中心)より臨床分離された *E. coli* 16,805株、*K. pneumoniae* 9,794株、計26,599株を対象に行ったわれわれの調査では、*E. coli* で15株、*K. pneumoniae* で33株のESBLs産生菌が認められた。PCR法によるそのgenotypeの内訳は *E. coli* でToho-1<sup>5)</sup>型が12株、TEM型が1株、SHV型が2株、*K. pneumoniae* ではToho-1型が12株、SHV型が21株であった。今回の調査ではESBLの分離頻度は少ないが、わが国でも欧米に多いTEM型、SHV型ESBLが存在すること、またToho-1型の占める割合が高いことがわかった。さらに学会報告としてMEN-1<sup>6)</sup>産生 *K. pneumoniae* やToho-2<sup>7)</sup>産生 *E. coli* の拡がりを見られる報告がみられており、わが国でのβ-ラクタマーゼ産生菌の分離状況が欧米とはかなり異なることが示唆されている。したがって、こうした状況をふまえてESBLの概念を整理し、わが国にあったESBLs検出法を考案しなければならないと考えられる。

## 3 ESBLs産生菌のスクリーニング法と確認法

図1にNCCLSの提唱するESBLs産生菌のスクリーニング法と確認法を示す。このスクリーニング基準では、各薬剤のブレイクポイントはMICで $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ に相当するが、こうした低いカットオフ値をとるのは、*in vitro*の感受性検査で感受性と判定されても、病変臓器への薬剤の移行性やinoculum効果などによって臨床上は薬剤に対して耐性となる菌株を落とさないようにするためである。このようにブレイクポイントを低く設定したとしても、スクリーニングには少なくとも2剤以上の薬剤を用いることが推奨されている。ESBL産生確認時には、clavulanic acid含有ディスクは用時作成するよう記されているが、わが国ではESBLs検出用としてcefepodoxime/clavulanic acid, cefotaxime/clavulanic acidおよびceftazidime/clavulanic acidディスクが発売され、確認テストはより容易に行うことができる(実際これらのESBLs検出用ディスクの評価は、今後の課題である)。

スクリーニングに使用する薬剤の選択には注意が必要である。薬剤によってESBL検出感度が異なるからである。分離されるESBLが多様なわが国では、スクリーニング薬剤によって発見されるESBLs数のみならず種類も少なからず差が生じる可能性がある。実際にToho-1産生菌のなかにはceftazidimeによるスクリーニングに引っかからない株が存在するし、Rbi-A<sup>8)</sup>などの *K. oxytoca* 由来の染色体性class A β-ラクタマーゼは、酵素学的定義からみてもESBLに入るかどうか疑問があるが、この酵素の過剰産生株はcefepodoxime, cefotaximeやaztreonamでのスクリーニングで“ESBL産生菌”として検出される<sup>9)</sup>。単剤であればcefepodoximeが、スクリーニング薬剤としてESBL産生菌検出感度が最も高いようであるが<sup>10)</sup>、*K. oxytoca*

スクリーニング法

スクリーニング感度をあげるため CPDX, CAZ, AZT, CTX, CTRX の5剤のうちいずれか2剤以上を用いる。

ディスク法

Standard disk diffusion 法で 35°C, 16~18 時間好気培養

CPDX 10 μg または  
CAZ 30 μg または  
AZT 30 μg または  
CTX 30 μg または  
CTRX 30 μg

CPDX, CAZ ≤ 22 mm  
CTRX ≤ 25 mm  
CTX, AZT ≤ 27 mm

ESBL 産生の疑い

MIC 法

Standard disk dilution 法で 35°C, 16~20 時間好気培養

CPDX 1 μg/ml または  
CAZ 1 μg/ml または  
AZT 1 μg/ml または  
CTX 1 μg/ml または  
CTRX 1 μg/ml

各5薬剤で  
MIC ≥ 2 mg/ml

ESBL 産生の疑い

ESBL 産生確認法 (Phenotypic Confirmatory Test)

ESBL 産生が疑われた菌株について行う

ディスク法

Standard disk diffusion 法で 35°C, 16~18 時間好気培養

CAZ 30 μg  
CAZ/CVA 30/10 μg  
かつ  
CTX 30 μg  
CTX/CVA 30/10 μg

CVA 入りのディスクで 5 mm 以上の阻止円径の拡大

ESBL 産生菌

MIC 法

Standard disk dilution 法で 35°C, 16~20 時間好気培養

CAZ 0.25~128 μg/ml  
CAZ/CVA 0.25/4~128/4 μg/ml  
かつ  
CTX 0.25~64 μg/ml  
CTX/CVA 0.25/4~64/4 μg/ml

CVA 入りの培地での MIC が 8 倍以上の低下

ESBL 産生菌

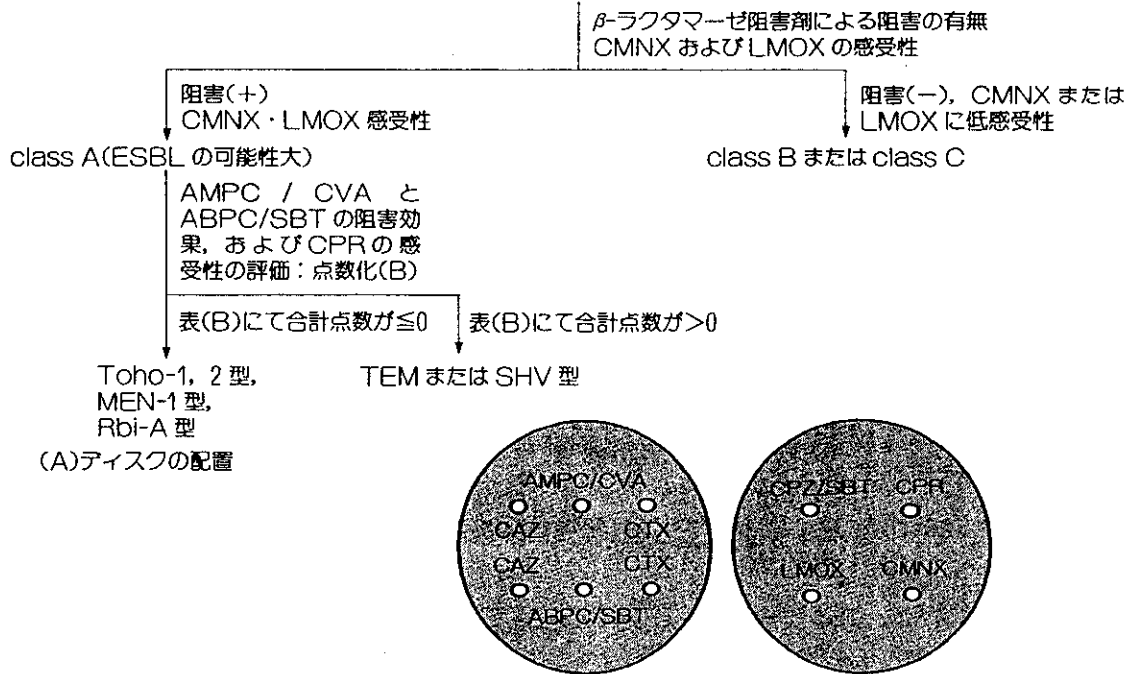
図1 NCCLS による ESBL 産生菌スクリーニングと確認法

由来の class A β-ラクタマーゼの評価も含め検出された ESBL の中身の検討が必要となるであろう。後に述べるような ESBLs の genotype の検討まで行うのであれば、スクリーニングの薬剤としては cefpodoxime が第1選択と考えられる。

また NCCLS では、この検出法で ESBL が確認された場合は、「すべてのペニシリン系、セファロsporin系薬剤と aztreonam には耐性である」と報告するよう勧告している。しかし、上記のような Toho-1 産生株の一部や *K. oxytoca* 由来の class A β-ラクタマーゼ産生株も区別せずにひとまとめにして、ESBL にはセファマイシンやカルバペネム以外に有効な β-ラクタム剤はないと報告するのがよいのか、また ESBL 産生菌が分離された部位によってその報告内容を変える必要はないのかどうか(たとえば尿路では一般に喀痰中などに比べ、より高い抗生剤濃度を達成できる)などの点は検討の余地があるように思われる。NCCLS の今回の指針では対象菌種に *K. oxytoca* が加えられているが、染色体性 class A β-ラクタマーゼ過剰産生菌と真の ESBL 産生菌の区別が必要であると考えられる。NCCLS の検出方法や自動化装置での ESBL 産生菌検出法ではこの区別ができず、多くの *K. oxytoca* は“ESBL 産生菌”と判定され混乱が生じると考えられる。こうしたことから、*K. oxytoca* を対象に入れることには筆者らは疑問を感じている。

Twin test

2枚の寒天平板培地に10種類の抗生剤含有ディスクを配置し(A), NCCLSの standard disk diffusion 法に基づいて35°C, 16~18時間培養した後判定する。



CTX: cefotaxime, AMPC/CVA: amoxicillin/clavulanic acid, CAZ: ceftazidime, CMNX: cefminox, CPZ/SBT: cefoperazone/sulbactam, LMOX: latamoxef, ABPC/ST: ampicillin/sulbactam, CPR: cefpirome

(B)点数化

点数	CVAとCTX, CAZによるDDT	SBTとCTX, CAZによるDDT	点数	CPRに対する感受性
+2	○(阻止帯あり)	○(阻止帯あり)	+1	感受性
-1	△(阻止帯はないが阻害効果はあり)	△(阻止帯はないが阻害効果はあり)	0	中間
-2	X(阻害作用なし)	X(阻害作用なし)	-1	耐性

阻止帯とは、CAZまたはCTXとAMPC/CVAやAMPC/ST(以下β-ラクタマーゼ阻害剤と記す)の間(感受性ディスク間)に、ディスクの並ぶ水平方向とは垂直な方向に、CAZまたはCTX自体の阻止円径より大きな阻害帯が発生している場合と定義する。

図2 Twin testの概要

4 ESBL遺伝子の検出法

ESBLをひとまとめにして検出しても疫学的見地からみて十分な情報は得られたとはいえない。1施設内でESBL産生菌の推移を検討する場合にも、多施設での分離状況の比較する場合も、ESBLのなかで少なくともどのようなgenotypeのESBLが分離されているかという大まかな区別が必要となる。ESBLのgenotypeを決定する最も迅速で確実な方法はPCRであるが、その実施に制約があることも事実である。ここで、われわれが考案したディスク拡散法およびDouble-Disk Test(DDT)<sup>9)</sup>に基づ