

図3 微量液体希釈法によるクラスC型β-ラクタマーゼ産生株の識別例

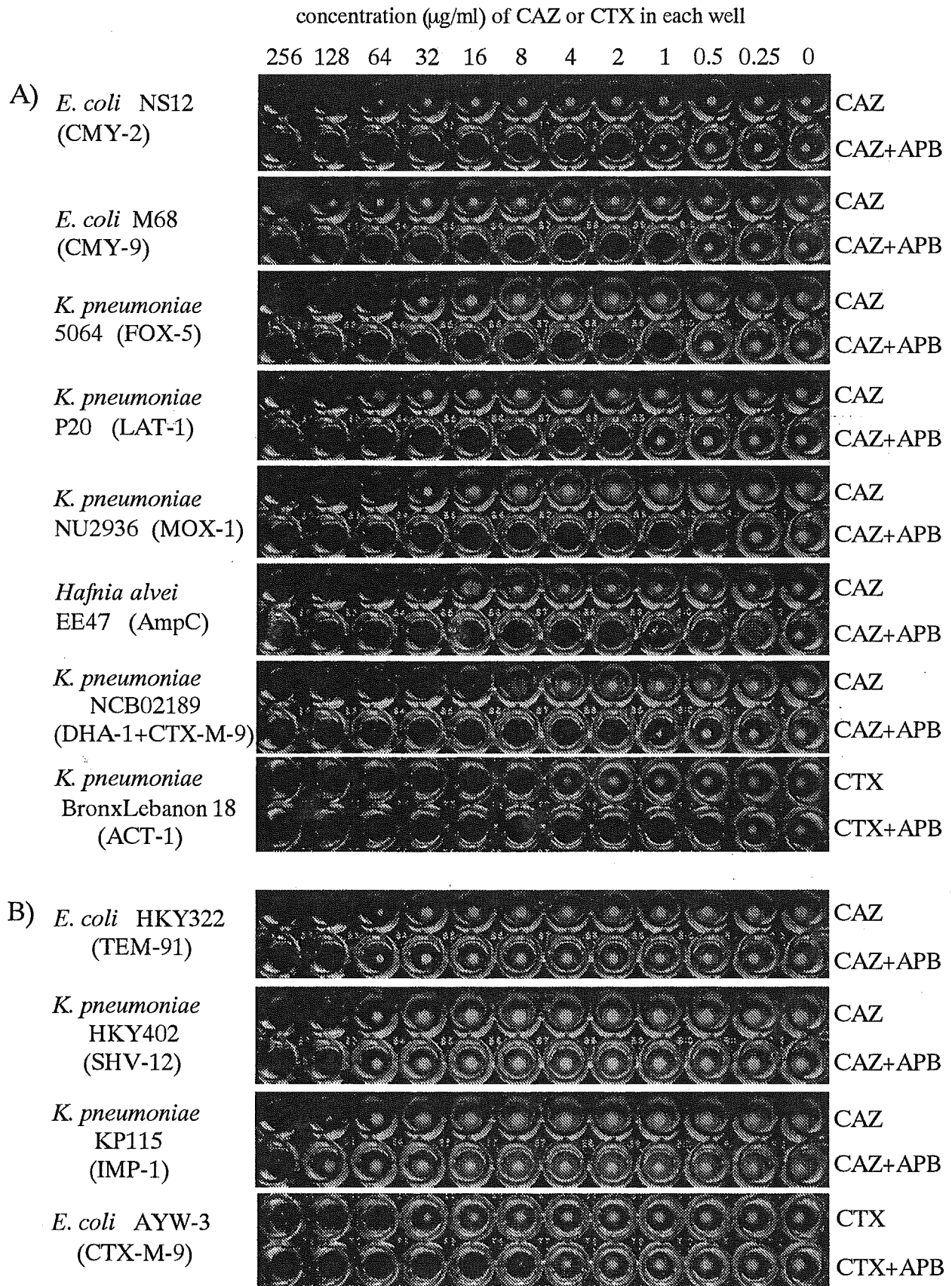


図4 ポロン酸化合物、クラブラン酸、チオール化合物を用いて、 β -ラクタマーゼのクラスを推定する実施例

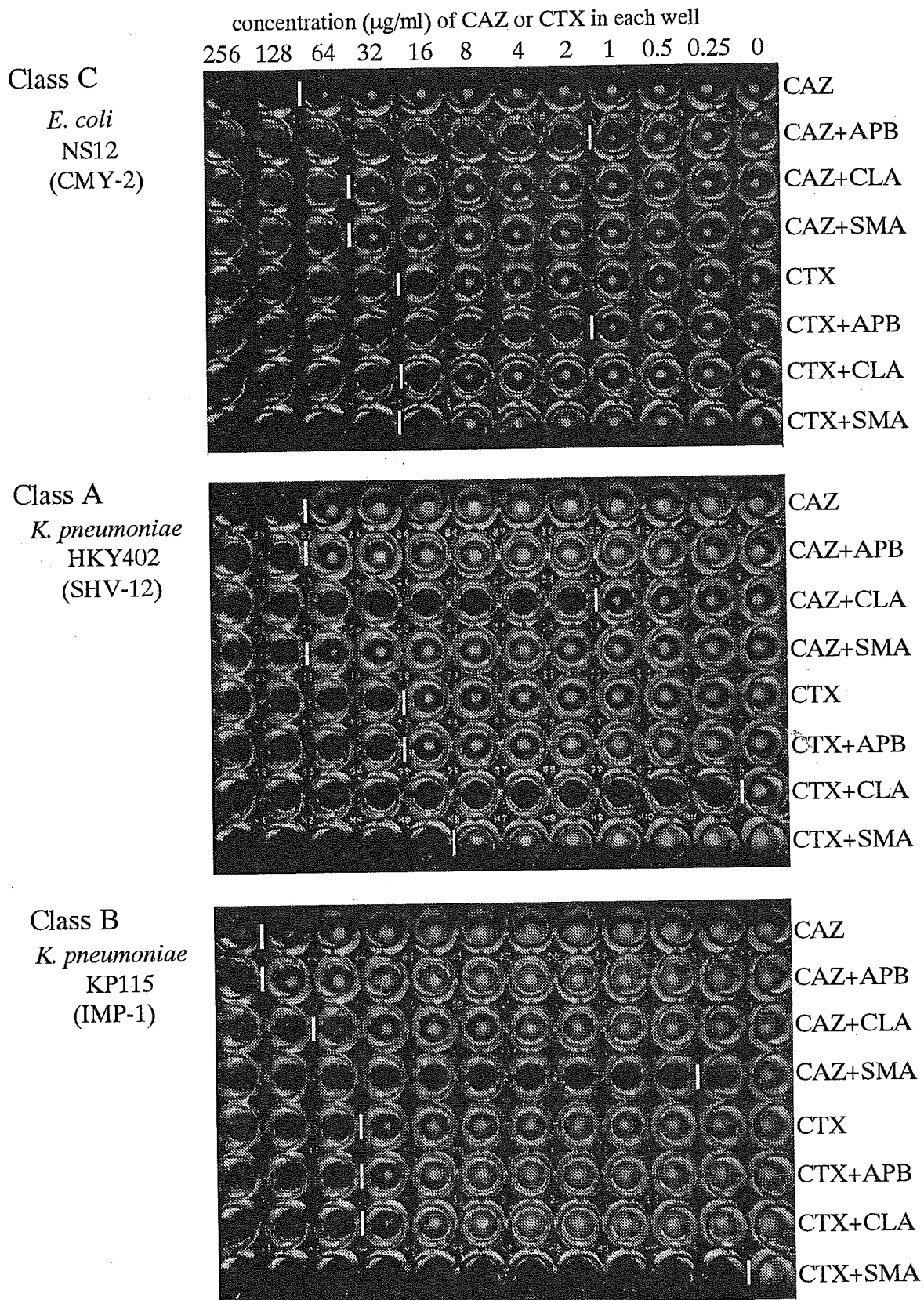


TABLE 1. Bacterial strains used in this study and MICs of CAZ and CTX with or without β -lactamase inhibitors

Strain	β -lactamase	MIC (μ g/ml)										Reference		
		CAZ	CAZ +CLA	CAZ +SMA	CAZ +APB	CTX	CTX +CLA	CTX +SMA	CTX +APB	CTX	CTX			
<i>E. coli</i> NS12	CMY-2	128	64	128	4	64	32	64	2	64	32	64	2	This study
<i>E. coli</i> HKY515	CMY-2	256	128	256	4	64	32	64	4	64	32	64	4	This study
<i>E. coli</i> HKY701	CMY-2	128	128	128	2	32	32	64	4	32	32	64	4	This study
<i>E. coli</i> MRY041197	CMY-2	>256	256	>256	8	128	128	128	8	128	128	128	8	This study
<i>E. coli</i> HKY581	CMY-2	256	128	256	8	128	128	256	4	128	128	256	4	This study
<i>E. coli</i> C502	CMY-2	256	256	256	16	16	32	32	2	16	32	32	2	This study
<i>E. coli</i> KG2	CMY-2	128	128	64	4	64	32	64	8	64	32	64	8	This study
<i>E. coli</i> MRY041243	CMY-8	256	256	>256	4	64	32	64	0.5	64	32	64	0.5	This study
<i>E. coli</i> M68	CMY-9	256	256	256	1	>256	>256	>256	16	>256	>256	>256	16	10
<i>E. coli</i> Coral Gables 66040	FOX-5	>128	>128	>128	4	64	64	64	1	64	64	64	1	G. A. Jacoby
<i>E. coli</i> Coral J53 (a transformant)	ACT-1	8	4	4	≤ 0.25	2	2	2	≤ 0.25	2	2	2	≤ 0.25	G. A. Jacoby
<i>E. coli</i> HKY28	mutant AmpC	64	32	64	4	16	4	8	1	16	4	8	1	11
<i>K. pneumoniae</i> NU2936	MOX-1	64	32	32	0.5	256	256	256	8	256	256	256	8	15
<i>K. pneumoniae</i> HKY-L1	MOX-1	32	32	32	1	128	128	128	4	128	128	128	4	This study
<i>K. pneumoniae</i> KPW142	CMY-8	32	32	64	1	128	128	128	4	128	128	128	4	This study
<i>K. pneumoniae</i> HKY209	CMY-9	>128	>128	>128	2	>128	>128	>128	2	>128	>128	>128	2	This study
<i>K. pneumoniae</i> HKY327	CMY-19	>256	>256	>256	16	64	64	64	1	64	64	64	1	This study
<i>K. pneumoniae</i> 5064	FOX-5	64	64	64	2	8	16	16	0.5	8	16	16	0.5	36
<i>K. pneumoniae</i> BronxLebanon 18	ACT-1	64	64	128	64	8	16	16	0.5	8	16	8	0.5	G. A. Jacoby
<i>K. pneumoniae</i> P20	LAT-1	64	64	64	2	32	32	32	1	32	32	32	1	40
<i>Hafnia alvei</i> EE47*	AmpC	64	128	64	2	32	64	64	2	32	64	32	2	This study
<i>E. coli</i> NCB03522**	CMY-2 + CTX-M-9	64	16	64	16	256	8	256	256	8	8	256	256	This study
<i>K. pneumoniae</i> NCB02189*	DHA-1 + CTX-M-9	16	128	16	1	32	8	32	2	32	8	32	2	This study

TABLE 1. Bacterial strains used in this study and MICs of CAZ and CTX with or without β -lactamase inhibitors (continued)

Strain	β -lactamase	MIC ($\mu\text{g/ml}$)										Reference		
		CAZ	CAZ +CLA	CAZ +SMA	CAZ +APB	CTX	CTX +CLA	CTX +SMA	CTX +APB	CTX	CTX +APB			
<i>E. coli</i> AYW-1	TEM-26	>128	0.5	>128	>128	2	<0.06	2	>128	2	<0.06	2	2	44
<i>E. coli</i> HKY322	TEM-91	128	0.5	128	>128	1	<0.06	1	>128	1	<0.06	1	1	18
<i>E. coli</i> MTY041435	TEM-132	64	1	64	64	8	\leq 0.25	4	64	4	\leq 0.25	4	4	This study
<i>E. coli</i> HKY453	SHV-24	>128	2	>128	>128	2	0.13	2	>128	2	0.13	2	2	17
<i>E. coli</i> NCB03515	CTX-M-1	32	\leq 0.25	16	16	>256	\leq 0.25	256	16	\leq 0.25	256	256	256	This study
<i>E. coli</i> MRY04718	CTX-M-3	64	1	32	32	>256	\leq 0.25	>256	32	\leq 0.25	>256	>256	>256	This study
<i>E. coli</i> AYW-2	CTX-M-2	8	0.13	8	4	>128	<0.06	>128	4	<0.06	>128	>128	>128	This study
<i>E. coli</i> NCB03490	CTX-M-2	4	\leq 0.25	4	1	32	\leq 0.25	256	1	\leq 0.25	256	64	64	This study
<i>E. coli</i> NCB03520	CTX-M-1	2	0.25	4	1	128	0.13	>128	1	0.13	>128	128	128	This study
<i>E. coli</i> AYW-3	CTX-M-9	0.5	<0.06	0.5	0.25	32	<0.06	64	0.25	<0.06	64	16	16	This study
<i>K. pneumoniae</i> HKY402	SHV-12	>128	1	>128	>128	32	<0.06	32	>128	<0.06	32	32	32	44
<i>K. pneumoniae</i> MRY041410	TEM-132	64	1	64	64	4	1	4	64	1	4	4	8	This study
<i>K. pneumoniae</i> K108	CTX-M-1	2	0.25	1	2	64	<0.06	64	2	<0.06	64	64	64	This study
<i>K. pneumoniae</i> MRY04322	CTX-M-3	16	1	8	8	128	1	128	8	\leq 0.25	128	128	128	This study
<i>K. pneumoniae</i> HKY495	CTX-M-2	16	1	16	16	128	1	128	16	0.13	>128	>128	>128	This study
<i>K. pneumoniae</i> NCB03504	CTX-M-2	2	\leq 0.25	2	4	64	\leq 0.25	128	4	\leq 0.25	128	64	64	This study
<i>K. pneumoniae</i> NCB03502	CTX-M-9	0.5	0.06	1	1	32	0.06	64	1	<0.06	64	32	32	This study
<i>K. pneumoniae</i> NCB03081	CTX-M-9	4	\leq 0.25	4	4	32	\leq 0.25	32	4	\leq 0.25	32	32	32	This study
<i>K. pneumoniae</i> KG525	GES-3J	>128	>128	>128	>128	64	>128	>128	>128	8	8	32	32	42
<i>K. pneumoniae</i> KG502	GES-4J	>128	>128	>128	>128	32	>128	>128	>128	16	16	16	16	43
<i>E. coli</i> NCB03426	IMP-1	64	64	\leq 0.25	64	16	64	64	64	16	16	\leq 0.25	16	This study
<i>E. coli</i> NCB02465	IMP-1	128	128	\leq 0.25	128	32	128	128	128	64	64	\leq 0.25	64	This study
<i>K. pneumoniae</i> KP115	IMP-1	>128	128	1	>128	64	128	64	>128	64	64	0.25	64	This study
<i>K. pneumoniae</i> NCB0334	IMP-1	64	64	\leq 0.25	64	128	64	128	64	128	128	\leq 0.25	128	This study
<i>E. coli</i> EE61	OXA-30	2	2	2	2	4	2	4	2	4	4	4	4	This study

* Production of AmpC and DHA-1 might be augmented in the presence of clavulanic acid.

***E. coli* strain NCB03522 also produces TEM-1 penicillinase.

Abbreviations: CAZ, ceftazidime; CTX, ceftaxidime; SMA, sodium mercaptoacetic acid; APB, 3-aminophenyl boronic acid.

新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び
迅速・簡便検出法に関する研究
- CTX-M 型 β -ラクタマーゼの分子型別 -

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

近年、国内外の医療現場では、広域 β -ラクタム薬に耐性を獲得した様々な菌種が出現し、増加傾向にあり、それらによる院内感染の発生が問題となりつつある。そこで国内の医療施設で2001～2003年に分離され、感染研に遺伝子の型別の解析依頼があった腸内細菌科および *Acinetobacter* 属菌 1,456 株について、CTX-M-型 β -ラクタマーゼのPCRによる検出を行ない、さらに詳しい遺伝子型別を317株について行った。

その結果、CTX-M-1, CTX-M-3 およびその新しい variant である CTX-M-36 の存在が確認された。また、CTX-M-2 とともにその variant である CTX-M-15 が複数の施設で分離され、さらに、その近縁の CTX-M-35 の存在も確認された。一方、CTX-M-9 とそれに近縁の CTX-M-14 が既に複数の国内の医療施設から分離される事が判明した。

我が国において、こうした β -ラクタマーゼを産生する株が、各種の病原性グラム陰性桿菌に広がりつつある事が確認されたため、今後の広がりを監視するとともにそれらを増やさないための実効性のある対策を急ぐ必要がある。

研究協力者:

柴田尚宏、黒川博史、和知野純一、八木哲也、山根一和、鈴木里和(国立感染症研究所 細菌第二部)

A. 研究目的

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生菌は、cefotaxime(CTX), cefoxitin, cefamandole および cefuroxime に対する伝達性の耐性を示す *Klebsiella pneumoniae* および *Serratia marcescens* として、Knothe らが1983年に初めて報告した。その後、1980年代には、CTX や cftazidime(CAZ)などの第三代セファロスポリンに耐性を示す *Klebsiella pneumoniae* や大腸菌が欧米を中心に分離されるようになり临床上問題となっている。我が国でも、1995年にIshiiらにより、Toho-1型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌が報告されて以来、CTX

に高い分解活性を示すもののCAZなどは殆ど分解できないCTX-M型 β -ラクタマーゼ産生菌が臨床現場で多く分離される傾向が認められる傾向にある。Yagiらは、Toho-1 like β -ラクタマーゼ産生菌の解析を行い、院内感染の様相を呈している事例も報告している。こうした事例から我が国ではCTX-M-2型 β -ラクタマーゼ産生菌が多いとされている。

CTX-M型 β -ラクタマーゼには、すでにCTX-M-1型からCTX-M-40型までバリエーションの報告があるが、我が国においては遺伝子型別からみたCTX-M型 β -ラクタマーゼ産生菌の正確な実態は把握されていない。

今回我々は、国内の医療施設で分離された広域セファロスポリン耐性グラム陰性桿菌の産生する臨床分離株のCTX-M型 β -ラクタマーゼ遺伝

子の型別を行い、その菌種と分布状況を把握するとともに、新しいβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出も念頭に解析を行った。

B. 研究方法

1. 解析に用いた菌株

2001年1月より2003年12月までの間に国内の医療施設から検査の依頼のあった1456株のグラム陰性菌のうち、NCCLSのスクリーニング基準を満たすESBLs産生疑いの317株について解析を行った。

2. ディスク拡散法

CAZおよびCTXとクラブラン酸、SBTに対する阻害効果(ESBLs産生性)とSMA(メルカプト酢酸ナトリウム)を用いた阻害効果(メタロβ-ラクタマーゼ産生性)を調べるため、ディスク拡散法による表現型の確認を行った。(Fig 1)

3. CTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子特異的プライマーを用いたPCR法とシーケンス解析

CTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子は、その遺伝子の相同性から4つの遺伝子型に分類されると考えられ、それぞれ特異的プライマーを作成し、PCR法による遺伝子型別を行いさらにPCR産物のダイレクトシーケンス解析も行った。プライマーデザインを表1に示す。

C. 研究結果

1. CTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌の国内分離状況と遺伝子型別

今回の解析の結果、PCR法では、CTX-M-1タイプ、CTX-M-2タイプ、CTX-M-9タイプの3つに分類された。さらにシーケンス解析の結果では、CTX-M-1タイプは、各々CTX-M-1, 3, 15, 36型に、CTX-M-2タイプは、各々CTX-M-2, 35型に、CTX-M-9タイプは、各々CTX-M-9と14型に分類されることが明らかとなった。こうしたβ-ラクタマーゼ遺伝子保有株は、主に腸内細菌科全般に分布していたが、一部*Acinetobacter baumannii*が

らも検出された。(表2)

2. ディスク拡散法の結果

ディスク拡散法による表現型の結果とシーケンス解析によるβ-ラクタマーゼ遺伝子型の結果は一致していた。

3. 新型のβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出

今回の解析で、新たにCTX-M-2型β-ラクタマーゼ遺伝子類似のCTX-M-35型β-ラクタマーゼ遺伝子を保有する菌株が大腸菌、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*S. marcescens*、*Enterobacter cloacae*および*A. baumannii*から検出された。さらにCTX-M-1型遺伝子類似の新型CTX-M-36型β-ラクタマーゼ遺伝子保有*K. pneumoniae*も検出された。(表2)

4. CTX-M型と他のβ-ラクタマーゼとの複数産生菌の検出

一部の菌種では、CTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子とAmpC、メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子を同時に保有する菌株も検出された。(表3)

D. 考察

今回の調査により、国内で臨床分離されるグラム陰性桿菌の中には、既にCTX-Mβ-ラクタマーゼ産生株が広く分布している明らかとなった。さらにCTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌は、CTX-M-1タイプ、CTX-M-2タイプ、CTX-M-9の大きく分けて3つにグループに分類され、各々CTX-M-3型、CTX-M-2型、CTX-M-9型およびM-14型が大勢を占めることが明らかとなった。

また、少数に留まるものの、*A. baumannii*でCTX-M型MBL産生株が検出されたことから、今後さらに、*P. aeruginosa*やその近縁の*P. putida/fluorescens*を含むブドウ糖非発酵菌群におけるCTX-M産生株の増加を警戒する必要がある。また、新型のCTX-M-35型および36型β-ラクタマーゼ産生菌も検出されており、今後の動向に注意する必要がある。

CTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌を検出する

方法として、今回用いたディスク拡散法は、簡便で有用であると考えられた。抗菌薬のディスクを組み合わせることにより、TEM-, SHV-型 ESBLs 産生菌や CTX-M 型 β -ラクタマーゼ産生菌だけでなく、AmpC 型やメタロ- β -ラクタマーゼなど複数の β -ラクタマーゼを産生する菌株を推定できる可能性が示唆された。

CTX-M 型 β -ラクタマーゼを産生することで、通常臨床現場で頻用される広域セファロスポリンに耐性を獲得したグラム陰性桿菌を増加させないために、今後もそれらの継続的監視とともに抗菌薬の適正使用の推進が強く望まれる。

E. 結 論

本研究により、国内で分離される腸内細菌やアシネトバクターの中に既に様々な CTX-M 型 β -ラクタマーゼを産生する株が出現し各地の医療施設に蔓延している事が明かとなった。

高度医療における日和見感染の原因菌として大腸菌などの腸内細菌を考えた場合、臨床現場で使用頻度が高い第三セファロスポリン抗菌薬に対し高度耐性を付与する、 β -ラクタマーゼの産生能力を獲得した臨床分離菌の出現は、化学療法実施の上で将来極めて深刻な影響を及ぼすことが懸念される。また、これらの遺伝子がプラスミド上に存在することから、今後、さらに各種のグラム陰性桿菌においてこうした β -ラクタマーゼ遺伝子の伝播拡散の危険性が強く懸念される。

F. 健康危険情報

我々の予備調査では 2001～2003 年の 36 ヶ月間に臨床分離された広域 β -ラクタム薬耐性の大腸菌など株中、少なくとも 317 株が CTX-M 型 β -ラクタマーゼ遺伝子を保有している事が判明した。CTX-M 型 β -ラクタマーゼ遺伝子を保有する株は、セフトキシム、アズトレオナムなどの臨床的に重要な β -ラクタム薬に広範な耐性を示す傾向があり、それらの増加は、臨床上大きな問題

となる。したがって、今後も引き続き、MBL 産生株の動向を監視するとともに、抗菌薬の適正使用も含め、実効ある対策を急ぐ必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. N Nagano, Y Nagano, C Cordevant, N Shibata, Y Arakawa. 2004. Nosocomial Transmission of CTX-M-2 β -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* in a Neurosurgery Ward. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 3978-3984.

2. N Nagano, N Shibata, Y Saitou, Y Nagano, Y Arakawa. 2003. Nosocomial Outbreak of Infections by *Proteus mirabilis* That Produces Extended-Spectrum CTX-M-2 Type β -Lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5530-5536.

3. Y Shiraki, N Shibata, Y Doi, Y Arakawa. 2004. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 β -lactamase in cattle, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 10(1), 69-75.

4. T Ohkawa, M Yoshinaga, N Ikärimoto, H Miyano-hara, K Miyata, Y Doi, N Shibata, Y Arakawa. 2002. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains that produce CTX-M-2-type broad spectrum β -lactamase isolated from a child with leukemia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21: 260-262.

2. 学会発表

1. 我が国における CTX-M 型 β -ラクタマーゼ産生菌の分布調査, 柴田尚宏, 和知野純一, 鈴木里和, 山根一和, 荒川宜親, 第 2 回薬剤耐性菌研究会, 2004

2. CTX-M 型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の広域伝播に関する検討 鈴木里和, 柴田尚宏, 和知野純一, 山根一和, 伊藤健一郎, 荒川宜親, 第 16 回日本臨床微生物学会, 2005

3. 当院で検出された CTX-M 型 β -ラクタマーゼ産生腸内細菌 4 症例の検討, 藪崎史子, 櫻田和

美、勝岡靖子、栗田雅史、柴田尚宏、荒川宜親, 第16回日本臨床微生物学会, 2005

4. 当院における ESBL 産生菌の集団発生について, 藤方理恵、越智美智、西原真二、田村ひろみ、古谷敬三、北尾孝司、鈴木里和、柴田尚宏、荒川宜親, 第16回日本臨床微生物学会, 2005

5. 当院で検出された ESBL 産生グラム陰性桿菌 8 症例について, 三浦明子、佐藤牧子、山田友紀、山端久美子、諏訪部章、柴田尚宏、荒川宜親, 第16回日本臨床微生物学会, 2005

6. 敗血症患者より検出された新規の CTX-M-36 β -ラクタマーゼを産生する *Klebsiella pneumoniae* について, 畑中公基、鈴木弘子、齋藤武郎、下地真哉、三田正行、柴田尚宏、荒川宜親, 第16回日本臨床微生物学会, 2005

7. Genotyping of CTX-M Type Class A β -lactamases Detected in Japan. : N. Shibata, Y. Doi, K. Shibayama, T. Yagi, Y. Arakawa. 41th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sept. 24, 2001, Chicago,

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記すべきものなし

2. 実用新案登録、その他

特記すべきものなし

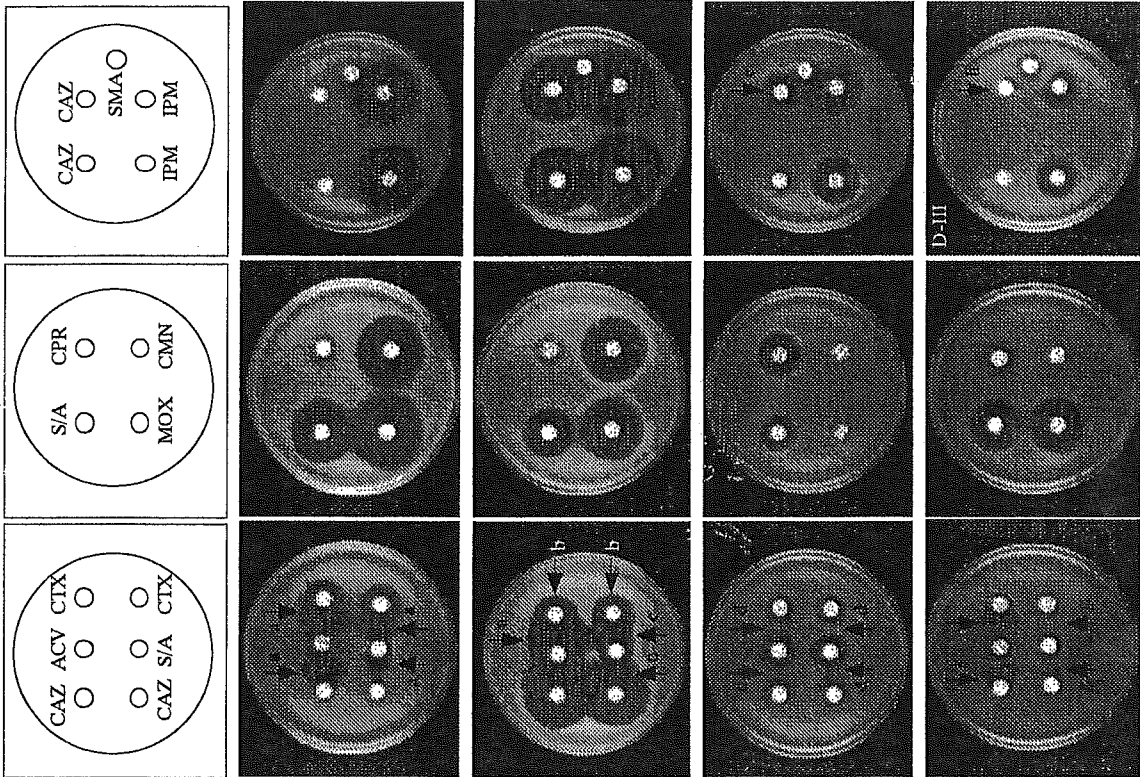


表 1 PCR 法各種 CTX-M 型β-ラクタマーゼ遺伝子特異的プライマーデザイン

gene	sequence	size of amplicon	reference
PCR primers for detection of <i>bla</i> genes			
<i>bla</i> _{TEM}	T1: 5'-CCG TGT CGC CCT TAT TCC-3'	824	51
	T2: 5'-AGG CAC CTA TCT CAG CGA-3'		
<i>bla</i> _{SHV}	S1: 5'-ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC-3'	1,051	51
	S2: 5'-TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC-3'		
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	M1-1: 5'-GCT GTT GTT AGG AAG TGT GC-3'	516	This study
	M1-2: 5'-CCA TTG CCC GAG GTG AAG-3'		
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	M2-1: 5'-ACG CTA CCC CTG CTA TTT-3'	780	51
	M2-2: 5'-CCT TTC CGC CTT CTG CTC-3'		
<i>bla</i> _{CTX-M-8} and <i>bla</i> _{CTX-M-25}	M8-1: 5'-CGG ATG ATG CTA ATG ACA AC-3'	552	This study
	M8-2: 5'-GTC AGA TTG CGA AGC GTC-3'		
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	M9-1: 5'-GCA GAT AAT ACG CAG GTG-3'	394	This study
	M9-2: 5'-CGC CGT GGT GTC TCT-3'		
PCR primers for sequencing analysis			
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	M1-3: 5'-AGA ATA AGG AAT CCC ATG-3'	992	This study
	M1-4: 5'-TTC CGC TAT TAC AAA CCG-3'		
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	M2-3: 5'-TTA ATG ATG ACT CAG AGC ATT C-3'	902	39
	M2-4: 5'-GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG-3'		
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	M9-3: 5'-GAT TGA CCG TAT TGG GAG TTT G-3'	999	This study
	M9-4: 5'-ATT TAC TTC CAT TAC TTT GCG G-3'		
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	M9-3: 5'-GAT TGA CCG TAT TGG GAG TTT G-3'	1087	This study
	M9-5: 5'-TTG AAC TTT TGC TTT GCC ACG G-3'		

表2. CTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌のシーケンス解析結果

Bacterial species	Number of strains isolated										Total
	CTX-M-1 group			CTX-M-2 group			CTX-M-9 group			Total	
	CTX-M-1	CTX-M-3	CTX-M-15	CTX-M-36	CTX-M-2	CTX-M-35	CTX-M-9	CTX-M-14			
<i>Escherichia coli</i>	1	19	13	0	39	7	35	54	168		
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	0	71	0	0	0	71		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	8	0	2	24	7	5	4	50		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	2	0	0	2	1	0	1	6		
<i>Serratia marcescens</i>	0	9	0	0	1	0	0	0	10		
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	1	2	0	0	3		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1		
<i>Citrobacter freundii</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	2		
<i>Citrobacter koseri</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1		
<i>Providencia rettgeri</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0	0	3	1	0	0	4		
Total	1	41	13	2	143	18	40	59	317		
						161		99			
									57		

表3. CTX-M型と同時β-ラクタマーゼ産生菌

Bacterial species	β-lactamase											
	CTX-M-1 group					CTX-M-2 group					CTX-M-9 group	
	CTX-M-3 &					CTX-M-2 &		CTX-M-35 &			CTX-M-9 &	
	AmpC	IMP-1	IMP-1&AmpC	IMP-1	IMP-1&AmpC	AmpC	IMP-1	IMP-1&AmpC	AmpC*	DHA-1	IMP-1	IMP-1
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	7	0	1	0	1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	0	0	0	0	7	0	0	1	0	
<i>Serratia marcescens</i>	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>Citrobacter koseri</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	
Total	11	1	1	1	1	6	15	3	1	1	1	

表4 CTX-M-β-ラクタマーゼを産生する株が確認された医療施設とその地域

Region in Japan	Number of medical facilities					Total number of strains
	Number of hospitals from which bacterial strains were submitted	Number of hospitals from which CTX-M-producers were identified	CTX-M-1 group (strain)	CTX-M-2 group (strain)	CTX-M-9 group (strain)	
Hokkaido	7	0	0(0)	0(0)	0(0)	0
Tohoku	17	4	1(2)	2(11)	3(6)	19
Kanto	26	9	7(14)	2(31)	5(12)	57
Chubu	37	22	9(22)	11(75)	14(39)	136
Kinki	19	10	4(11)	4(30)	5(13)	54
Chugoku	13	5	0(0)	3(5)	3(8)	13
Shikoku	5	3	0(0)	2(2)	2(17)	19
Kyushu & Okinawa	8	4	3(8)	3(7)	2(4)	19
Total	132	57	24(57)	27(161)	34(99)	317

日本で初めての院内感染症例から分離されたバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の解析

主任研究者 池 康嘉^{1,2}

研究協力者 富田 治芳¹、鄭 波¹、井上 貴子¹、野村 隆浩¹、谷本 弘一²、藤本 修平¹、

戸所 大輔¹、麻 興華¹、

群馬大学大学院医学系研究科細菌感染制御学¹、同薬剤耐性菌実験施設²

研究要旨 日本で 1999 年に初めて起きた VRE 院内感染症事例が報告された。報告では 4 人の入院患者の喀痰、尿から VRE が分離された。その後、入院患者の便を検査したところ 16 人が VRE を保菌していた。分離された VRE は全て VanB 型 *E. faecalis* 株であり、PFGE による解析から 1 株を除き全て類似の染色体 DNA パターンを示し、同一の株による院内感染が考えられた。これらの株はバンコマイシン耐性プラスミドを保持していた。染色体パターンの異なる 1 株は染色体上に耐性遺伝子が存在する。今回この病院で分離された VRE 19 株の詳しい解析を行った。耐性遺伝子が染色体に存在する 1 株を除き、全てのバンコマイシン耐性が液体培地中で供与菌当たり $10^{-4} \sim 10^{-6}$ の高頻度で接合伝達した。代表的な株として HGH22 を選び解析した。この株は接合伝達性バンコマイシン耐性プラスミド pUI22 (107kb) の他に接合伝達性エリスロマイシン耐性プラスミド pTI22 (70kb) を保持していた。pUI22 プラスミドにコードされる VanB 型耐性遺伝子は *vanS_B-vanY_B* 領域の塩基配列の解析から *vanB2* 型に分類された。Southern hybridization の解析から pUI22 はフェロモン反応性プラスミドに保存されている接合伝達制御領域を持ち、さらに合

成フェロモン cCF10 により凝集が誘導されたことから pCF10 (54kb, Tet^r) 類似のフェロモン反応性接合伝達性プラスミドと考えられた。pUI22 の全塩基配列を決定した。pUI22 は 106,524bp の大きさで、*vanB2*型耐性遺伝子を含む接合伝達性トランスポゾン Tn1549 (34kb, Van^r) が挿入したフェロモン反応性プラスミドであった。pTI22 はエリスロマイシン耐性の他に β -Hemolysin/Bacteriocin(Hly/Bac)をコードし、液体培地中で供与菌当たり 10^{-3} ~ 10^{-4} の高頻度に接合伝達した。合成フェロモン cAD1 によって凝集が誘導されたことから pTI22 は pAD1 (60kb, Hly/Bac) 類似のフェロモン反応性プラスミドと考えられた。

A. 目的

度が少ない国であった。平成 14 年度の全国の医療機関、特に高度先進医療が実施される VRE 分離状況の調査では、全国の医療施設のうち 31 施設 128 例から VanA、VanB および VanD 型 VRE が分離された。このうち VanA 型 71 例 (55%)、VanB 型 56 例 (44%)、VanD 型 1 例 (1%) であった。日本では VanB 型 VRE が比較的多く分離されることが特徴である。日本で初めては、患者の状態により、それらの感染症に対する有効な治療薬が存在しないことがおこり得るために問題となる。日本はいわゆる先進国では VRE が医療現場、環境中からの分離頻度の集団院内感染例から分離されたのは *E. faecalis* VanB 型 VRE であった。この時の院内感染例から 19 株の *E. faecalis* VanB 型 VRE が分離された。これまでにこの時の代表株

HGH22 株から、VanB プラスミドを分離し報告した。今回この VanB プラスミドの詳細な解析と、これとは別に HGH22 株が含んでいたβ溶血プラスミドの解析結果を報告する。

B. 材料と方法

菌株と培養方法 今回の調査には、H病院にて分離された *E. faecalis* (VanB type) 19 菌株を用いた。これらは、日本で初めて検出された VanB 型の VRE である。今回の実験においてこれらの菌株は、Todd-Hewitt broth (THB) または Brain Heart Infusion (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 中で培養した。

接合伝達実験 バンコマイシン (VCM) 耐性が接合伝達されるか否かについて、検出された 19 株においての実験を行った。受容菌として *E. faecalis*、プラスミドを持たない FA2-2 (リファンピシン、フシジン酸耐性) と JH2SS (ス

トレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性) を用い、液体培地中での接合伝達実験を行った。滅菌された試験管に Todd-Hewitt broth (THB) 5ml、受容菌 500μl、供与菌 50μl を混合し、37°Cで 3 時間培養した。その後、混合液 50μl を vancomycin (6μg/ml) と抗生剤を入れた固体培地 Brain Heart Infusion(BHI) に植え、37°Cで 48 時間培養した。発育したコロニーは、同種の培地にて純培養した。同様の手法で、再伝達実験、再々伝達実験も行った。固体培地の抗生剤濃度はそれぞれリファンピシン 25μg/ml、フシジン酸 25μg/ml とストレプトマイシン 250μg/ml、スペクチノマイシン 250μg/ml とした。

その他 下記の方法は概報に従った。

- ・MIC 測定
- ・アガロースゲル電気泳動
- ・pU122 の制限酵素地図の作成
- ・PCR

- ・サザンハイブリダイゼーション
- ・DNA 塩基配列決定等

塩基配列から 3 種類 (VanB1~VanB3) 報告されている。この領域の塩基配列から、これらの株は VanB2 型であった (図 2)。

C. 結果、考察

菌種と薬剤耐性 すべての菌種は *E. faecalis* 菌で、VRE 型は VanB 型であった。薬剤耐性値は Van 高度耐性、Teic 低感受性、他の薬剤の耐性は Gm、Km、Em、Tc、CRFX 耐性で、それぞれの薬剤の耐性値は 1 株 (菌株番号 HGH44) を除く同じ耐性値であった (表 1)。これらの株のうち 14 株は β Hly/Bac 活性を示した。

染色体 DNA の PFGE による解析 それぞれの菌株の染色体 DNA の *Sma*I 断片の PFGE (pulsed field gel electrophoresis) の結果 (菌株番号 HGH44) を除き、すべて同一型を示した (図 1)。これは同じ VanB 型 VRE による院内感染を示唆するものである。

VanB 型 VanB 型 VRE は vanS_9 - vanY_9 領域の

VanB 耐性遺伝子の接合伝達性 19 株の VRE

の Van 耐性の受容菌 *E. faecalis* FA2-2 (Rif, Fus) への接合伝達性を調べた。1 株 (菌株 44) を除き、すべての VRE の Van 耐性が液体培地中で供与菌あたり 10^{-3} ~ 10^{-7} の頻度で接合伝達された (表 2)。HGH22 株から分離されたプラスミド PUI22 (107kb) を選び、解析を行った。プラスミド DNA の *vanB* probe を用いた Southern hybridization (281)により *vanB* 遺伝子は接合伝達性プラスミド上に存在した (図 3)。

E. faecalis のフェロモン反応性プラスミド

フェロモン反応性プラスミド pAD1 の接合伝達制御領域をプローブにし、pUI22 の *Eco*RI 断片との Southern hybridization を行った結果、特異的な *Eco*RI 断片と相補結合を

行った (図4)。 *E. faecalis* FA2-2 (pUI22) 株の合成フェロモンに対する反応を調べた結果、よく解析されているフェロモン反応性プラスミド pCF10 に対応するフェロモン cCF10 に反応するプラスミドであった。

pUI22 の制限酵素地図と塩基配列 pUI22

(107 kb) の制限酵素地図を作製し、さらに shot-gun 法で全塩基配列を決定した (図5)。

pUI22 は 106,525 bp の大きさで、VanB2 型耐性遺伝子を持つトランスポゾン Tn1549 (34kb, VanB2) が挿入されたプラスミドである (図6)。 相同性の検索で pCF10 と相同性のある接合伝達領域の遺伝子が存在した。

エリスロマイシン耐性β溶血性プラスミド

E. faecalis HGH22 株は plasmid pUI22 (Van^r 107 kb) による Van の接合伝達とは独立し、エリスロマイシン耐性が高頻度 (供与菌あたり 10^{-3} ~ 10^{-4}) に接合伝達された。接合伝達株はエリスロマイシン耐性とβ溶血を示した

(図8)。単離されたプラスミド pTI22 (70 kb)

はエリスロマイシン耐性β溶血をコードし、フェロモン反応性プラスミドでプラスミド pTT32 に対応するフェロモンはβ溶血性プラスミド pAD1 (60 kb, Hly/Bac) プラスミドに対するフェロモン反応性 CAD1 であった (図8)。

D. 結論

アメリカ合衆国、EU 各国で報告されている VRE は *E. faecium* 菌で、その多くは VanA 型 VRE である。米国においては *E. faecium* VanA 型が 90%以上を占める。VanB 型 VRE の VanB 遺伝子はトランスポゾン Tn1549 (34kb) 上に存在し、Tn1549 は一般的に染色体上に存在する。

これまでの報告で *E. faecalis* VRE 分離例は *E. faecium* VRE に比較して少ない。*E. faecalis* のフェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド上に存在する Van 遺伝子は一般的でない。今回解析した VanB 型 VRE の Van 遺

伝子は *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミド上に VanB 遺伝子が存在し、高頻度に接合伝達された。また、この VRE の β 溶血性、エリスロマイシン耐性遺伝子は同一菌に存在する他のフェロモン反応性プラスミドにそれらの遺伝子が存在した。19 株のうち 14 株は VamB, β -Hly/Em^r の形質を示し、そのうちの 13 株は VanB プラスミド/ β -Hly/Em^r プラスミドをそれぞれ含むものであった。これらの結果はこれらの院内感染菌が生体の腸管に定着しやすい性を保持している可能性も示唆される。特に β -Hly をコードする pAD 型プラスミドは *E. faecalis* の代表的な病原性プラスミドとされている。

E. 健康危険情報

特記すべき事項なし

F. 研究発表

- 1: Takeuchi K, Tomita H, Fujimoto S, Kudo M, Kuwano H, Ike Y. Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits. **FEMS Microbiol Lett.** 2005 15;243(2):347-54.
- 2: Tomita H, Ike Y. Tissue-specific adherent *Enterococcus faecalis* strains that show highly efficient adhesion to human bladder carcinoma T24 cells also adhere to extracellular matrix proteins. **Infect Immun.** 2004 72(10):5877-85.
- 3: Arakawa Y, Ike Y, Nagasawa M. Where has vancomycin-heterogeneously resistant *Staphylococcus aureus* gone? **Lancet.** 2004 24;363(9418):1401.

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1. HGH病院分離VRE 19株の菌種、Van型、薬剤耐性、 β -溶血性

症例	菌株	菌種	VRE型(PCR)	MIC(μ g/ml)													β -Hly/Bac
				VCM	TEIC	GM	KM	SM	EM	CP	TC	ABPC	CPFX				
30	HGH7	<i>E. faecalis</i>	VanB	128	0.25	>1024	>1024	>1024	32	0.25	8	64	4	64	+		
31	HGH8	<i>E. faecalis</i>	VanB	256	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	8	64	4	64	+		
32	HGH9	<i>E. faecalis</i>	VanB	64	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	8	32	4	63	+		
33	HGH10	<i>E. faecalis</i>	VanB	64	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	4	32	4	63	+		
34	HGH11	<i>E. faecalis</i>	VanB	64	0.25	>1024	>1024	>1024	32	0.125	8	64	4	64	-		
35	HGH12	<i>E. faecalis</i>	VanB	64	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	4	64	4	64	+		
36	HGH13	<i>E. faecalis</i>	VanB	64	0.25	>1024	>1024	>1024	32	0.125	8	64	8	64	-		
37	HGH14	<i>E. faecalis</i>	VanB	256	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	8	64	8	64	+		
38	HGH15	<i>E. faecalis</i>	VanB	256	0.25	1024	>1024	>1024	16	>1024	8	64	8	64	+		
39	HGH16	<i>E. faecalis</i>	VanB	256	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	8	64	4	64	+		
40	HGH17	<i>E. faecalis</i>	VanB	64	0.25	>1024	>1024	>1024	32	0.125	8	64	4	64	-		
41	HGH18	<i>E. faecalis</i>	VanB	256	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	8	64	4	64	+		
42	HGH19	<i>E. faecalis</i>	VanB	256	0.125	>1024	>1024	>1024	32	>1024	8	64	8	64	+		
43	HGH20	<i>E. faecalis</i>	VanB	256	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	8	64	8	64	+		
44	HGH21	<i>E. faecalis</i>	VanB	8	0.25	8	>1024	>1024	>1024	>1024	64	64	1	2	+		
45	HGH22	<i>E. faecalis</i>	VanB	64	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	8	32	4	64	+		
46	HGH23	<i>E. faecalis</i>	VanB	64	0.25	>1024	>1024	>1024	32	0.125	4	32	8	64	-		
47	HGH24	<i>E. faecalis</i>	VanB	32	<0.125	>1024	>1024	>1024	32	0.125	4	32	8	64	-		
48	HGH25	<i>E. faecalis</i>	VanB	64	0.25	>1024	>1024	>1024	32	>1024	8	32	8	64	+		