

- Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* 41:3542-3547.
35. Riccio, M. L., J. D. Docquier, E. Dell'Amico, F. Luzzaro, G. Amicosante, and G. M. Rossolini. 2003. Novel 3-*N*-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ic*, from a *Pseudomonas aeruginosa* integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1746-1748.
 36. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 37. Schwocho, L. R., C. P. Schaffner, G. H. Miller, R. S. Hare, and K. J. Shaw. 1995. Cloning and characterization of a 3-*N*-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ib*, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1790-1796.
 38. Sekiguchi, J., T. Asagi, T. Miyoshi-Akiyama, T. Fujino, I. Kobayashi, K. Morita, Y. Kikuchi, T. Kuratsuji, and T. Kirikae. 2005. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and its *aac(6')-Iae* gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3734-3742.
 39. Sekiguchi, J., T. Asagi, T. Miyoshi-Akiyama, A. Kasai, Y. Mizuguchi, M. Araake, T. Fujino, H. Kikuchi, S. Sasaki, H. Watari, T. Kojima, H. Miki, K. Kanemitsu, H. Kunishima, Y. Kikuchi, M. Kaku, H. Yoshikura, T. Kuratsuji, and T. Kirikae. 2007. Outbreaks of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 45:979-989.
 40. Sekiguchi, J., K. Teruya, K. Horii, E. Kuroda, H. Konosaki, Y. Mizuguchi, M. Araake, A. Kawana, H. Yoshikura, T. Kuratsuji, H. Miyazaki, and T. Kirikae. 2007. Molecular epidemiology of outbreaks and containment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Tokyo hospital. *J. Infect. Chemother.* 13:418-422.
 41. Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57:138-163.
 - Stokes, H. W., D. B. O'Gorman, G. D. Recchia, M. Parsekhian, and R. M. Hall. 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol. Microbiol.* 26:731-745.
 - Tenover, F. C., D. Filpula, K. L. Phillips, and J. J. Plorde. 1988. Cloning and sequencing of a gene encoding an aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferase from an R factor of *Citrobacter diversus*. *J. Bacteriol.* 170:471-473.
 - Vakulenko, S. B., and S. Mobashery. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:430-450.
 - Vanhoof, R., E. Hannecart-Pokorni, and J. Content. 1998. Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:483.
 - Watanabe, M., S. Iyobe, M. Inoue, and S. Mitsuhashi. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:147-151.
 - Wright, G. D. 1999. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:499-503.
 - Wright, G. D., and P. Ladak. 1997. Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferase from *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:956-960.
 - Yokoyama, K., Y. Doi, K. Yamane, H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, H. Kato, and Y. Arakawa. 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362:1888-1893.
 - Zhu, C. B., A. Sunada, J. Ishikawa, Y. Ikeda, S. Kondo, and K. Hotta. 1999. Role of aminoglycoside 6'-acetyltransferase in a novel multiple aminoglycoside resistance of an actinomycete strain #8: inactivation of aminoglycosides with 6'-amino group except arbekacin and neomycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 52:889-894.

KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate[∇]

Jun-ichiro Sekiguchi,¹ Koji Morita,^{2*} Tomoe Kitao,¹ Noboru Watanabe,² Mitsuhiro Okazaki,³
Tohru Miyoshi-Akiyama,¹ Masato Kanamori,² and Teruo Kirikae¹

Department of Infectious Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan¹;
Department of Microbiology, Kyorin University School of Health Sciences, Hachioji, Tokyo 192-8508, Japan²; and
Department of Clinical Laboratory, Kyorin University Hospital, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan³

Received 17 October 2007/Returned for modification 2 December 2007/Accepted 1 August 2008

A novel gene, *bla*_{KHM-1} encoding a metallo- β -lactamase, KHM-1, was cloned from a clinical isolate of *Citrobacter freundii* resistant to most β -lactam antibiotics. *Escherichia coli* expressing *bla*_{KHM-1} was resistant to all broad-spectrum β -lactams except for monobactams and showed reduced susceptibility to carbapenems. Recombinant KHM-1 exhibited EDTA-inhibitable hydrolytic activity against most β -lactams, with an overall preference for cephalosporins.

Acquired metallo- β -lactamases (MBLs) produced by gram-negative bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., and several enterobacteria, confer resistance to all β -lactams except the monobactams (2). Acquired MBLs are categorized on the basis of amino acid sequences into various types (2, 23). The IMP- and VIM-type enzymes are the most common and are found worldwide (2, 8, 23). Recently, four additional types, SPM, GIM, SIM, and AIM, have been found in Brazil (21), Germany (3), Korea (11), and Australia (24), respectively. We report here on the detection of a novel acquired MBL in a clinical isolate of *Citrobacter freundii* identified in Japan.

C. freundii strain KHM243 was isolated in 1997 from a patient with catheter-associated urinary tract infection at Kyorin University Hospital (Tokyo, Japan). *Escherichia coli* K-12 strain W1895 was used as the recipient in conjugation experiments. *E. coli* JM109 (Takara Bio, Shiga, Japan) was used as the host for recombinant plasmids. Plasmid pHSG396 (Takara Bio) was used for the cloning of *bla*_{KHM-1} fragments.

Susceptibility to β -lactams was determined by the microdilution method (4). The production of MBL was detected by a double-disk synergy test with disks containing sodium mercaptoacetic acid (MBL production test; Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan), as described by Arakawa et al. (1).

The transfer of resistance by conjugation was analyzed as described previously (7). *E. coli* transconjugants were selected on Penassay broth agar (antibiotic medium no. 3; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) containing rifampin (200 μ g/ml; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) and moxalactam (16 μ g/ml; Shionogi & Co., Ltd., Osaka, Japan). Plasmid DNA was extracted by an alkaline lysis procedure (9). Plasmid R100 (94.5 kb) (13) from *E. coli* CSH2, plasmid R478 (275 kb) (6) from *E. coli* J53, and three cryptic plasmids (200,

60, and 2.4 kb) from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis L119 (15) were used as molecular size markers.

PCR analysis specific for class 1 integrons was performed as described previously (12). DNA sequences flanking *bla*_{KHM-1} were determined by inverse PCR (16). Briefly, plasmid DNA extracted from *E. coli* transconjugant W1895(pCF243) was digested with EcoRV or XspI (Takara Bio). Self-ligated digests were used as the template for an inverse PCR. The upstream and downstream flanking regions of *bla*_{KHM-1} were amplified by inverse PCR with two sets of primers: primers 5'-CGATA TAACAAGAGCTATTTTCAT-3' and 5'-GGTATGCGCTG ACGATTC-3' for the upstream region and primers 5'-GGTG TACAGATAAACGCCG-3' and 5'-TTTATTTGGTGGCTG TTTTGTC-3' for the downstream region.

The KHM-1 MBL from *E. coli* JM109(pKHM-1) was purified with HiTrap Q HP and Superdex 200 columns (GE Healthcare Bio-Sciences KK, Tokyo, Japan), as described by Franceschini et al. (5). During the purification procedure, the presence of β -lactamase activity was monitored with 100 μ M nitrocefin (Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom). The protein concentration was determined with a bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Kinetic analysis was carried out in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) at 25°C with a UV-visible spectrophotometer (V-530; Jasco, Tokyo, Japan). The K_m and k_{cat} values and the k_{cat}/K_m ratio were determined by analyzing β -lactam hydrolysis under initial-rate conditions by use of the Lineweaver-Burk plot.

Antibiotic susceptibility testing showed that *C. freundii* KHM243 was resistant to most β -lactams and showed reduced susceptibility to carbapenems (Table 1). However, KHM243 was susceptible to monobactams (carumonam and aztreonam). The isolate was positive by the MBL production test (data not shown).

C. freundii KHM243 has two plasmids, one of approximately 70 kb and one of approximately 200 kb. A conjugation experiment was done with KHM243 and *E. coli* W1895. W1895 transconjugants that were resistant to β -lactams and that contained a 200-kb plasmid, designated pCF243, were obtained. The transconjugant exhibited a profile of susceptibility to β -lactams similar to that of KHM243, although the MICs for

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Kyorin University School of Health Sciences, 476 Miyashitacho, Hachioji, Tokyo 192-8508, Japan. Phone: (81) 42 691 0011, ext. 4125. Fax: (81) 42 691 1094. E-mail: moritako@kyorin-u.ac.jp.

[∇] Published ahead of print on 2 September 2008.

TABLE 1. MICs of β -lactams for *C. freundii* KHM243, *E. coli* W1895(pCF243) transconjugant, *E. coli* JM109(pKHM-1) expressing the KHM-1 MBL, and *E. coli* host strains

Antibiotic(s) ^a	MIC (μ g/ml)				
	<i>C. freundii</i> KHM243	<i>E. coli</i> W1895 (pCF243) ^b	<i>E. coli</i> W1895	<i>E. coli</i> JM109 (pKHM-1) ^c	<i>E. coli</i> JM109
Ampicillin	256	64	8	16	1
Ampicillin-subactam	64	64	1	16	0.5
Ticarcillin	>512	>512	2	512	2
Ticarcillin-clavulanic acid	512	>512	4	512	2
Piperacillin	4	16	2	4	0.25
Cephaloridine	512	128	2	64	1
Cefuroxime	>512	>512	2	>512	8
Ceftazidime	>512	>512	0.125	>512	0.063
Cefotaxime	64	>512	0.008	128	0.004
Cefepime	32	>512	0.002	64	0.004
Cefozopran	16	256	0.016	64	0.008
Imipenem	2	4	0.063	0.5	0.063
Meropenem	4	4	0.004	4	0.004
Aztreonam	0.25	0.063	0.031	0.063	0.031
Carumonam	0.25	0.125	0.031	0.063	0.031
Cefoxitin	512	>512	8	>512	8
Cefmetazole	512	512	0.5	>512	0.25
Cefotetan	128	512	0.125	>512	0.031
Cefbuperazone	128	256	0.063	512	0.031
Cefminox	512	>512	0.125	512	0.25
Moxalactam	256	>512	0.063	>512	0.031
Flomoxef	64	256	0.031	128	0.031

^a The ratio of the ampicillin to subactam was 2:1. The ratio of ticarcillin to clavulanic acid was 15:1.

^b Natural plasmid carrying the *bla*_{KHM-1} gene.

^c Recombinant plasmid constructed by insertion of DNA fragment containing the *bla*_{KHM-1} gene into the cloning vector pHSG396.

some cephalosporins, including cefotaxime, cefepime, and ceftazidime, were significantly higher in the transconjugant than in KHM243 (Table 1).

EcoRI-digested fragments of pCF243 were subcloned into pHSG396 and were transformed into *E. coli* JM109 cells, and transformants were selected on agar medium containing moxalactam (1 μ g/ml). Strain JM109 carrying the plasmid that conferred resistance to moxalactam, named pKHM-1, exhibited a profile of susceptibility to β -lactams similar to the susceptibility profiles of KHM243 and the *E. coli* W1895 transconjugant carrying pCF243 (Table 1). However, the MICs of some antibiotics, including cefotaxime and cefepime, were lower for the transformant carrying pKHM-1 than the transconjugant. This might be explained by insufficient expression of the gene due to insertion of the DNA fragment with a small 5'-flanking region.

pKHM-1 contained an 837-bp insert with a complete open reading frame (ORF) (data not shown). The 726-bp ORF encoded a putative protein of 241 amino acids. The protein was similar to MBLs, such as Uvs123 from an uncultured bacterium (82% identity) (22), IMP-1 (59% identity) (17), and SIM-1 (59% identity) (11) (Fig. 1). The protein was somewhat less similar to VIM-1 (38% identity) (10), GIM-1 (50% identity) (3), and SPM-1 (46% identity) (21) (Fig. 1). We named the ORF encoding the protein *bla*_{KHM-1} and designated the protein KHM-1 (Kyorin Health Science MBL 1). *bla*_{KHM-1} was different from the *Citrobacter freundii* genome in its GC contents (GC contents, 50.27% and 44.63%, respectively) and codon usage (data not shown). KHM-1 contained amino acid motifs conserved in MBL enzymes, including a zinc-binding

motif (HXHXD, residues 97 to 101) and three other residues involved in zinc binding (residues 159, 178, and 217) (Fig. 2) (18, 23).

The DNA sequences flanking *bla*_{KHM-1} were determined from 774 bp upstream to 806 bp downstream of it. No sequence homologies for site-specific cointegration events, ORFs, or transmissible elements were detected within the 774-bp upstream of *bla*_{KHM-1}. A 360-bp ORF encoding a putative protein of 119 amino acids with 77% identity to hypothetical protein VP1798 of *Vibrio parahaemolyticus* (14) was located in the fragment 21 to 380 bp downstream of *bla*_{KHM-1}. Strain KHM243 carried a class 1 integron with an array of two gene cassettes, which carried the *aadA2* (20) and *aac(6')-Iae* (19) aminoglycoside resistance determinants; however, *bla*_{KHM-1} was not detected in this integron.

Analysis of the purified KHM-1 protein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis showed a single 25-kDa band. The activity of KHM-1 against various β -lactams was analyzed with the purified protein. It showed hydrolytic activity against all β -lactams tested except aztreonam (Table 2). Enzymatic activity against aztreonam was undetectable un-

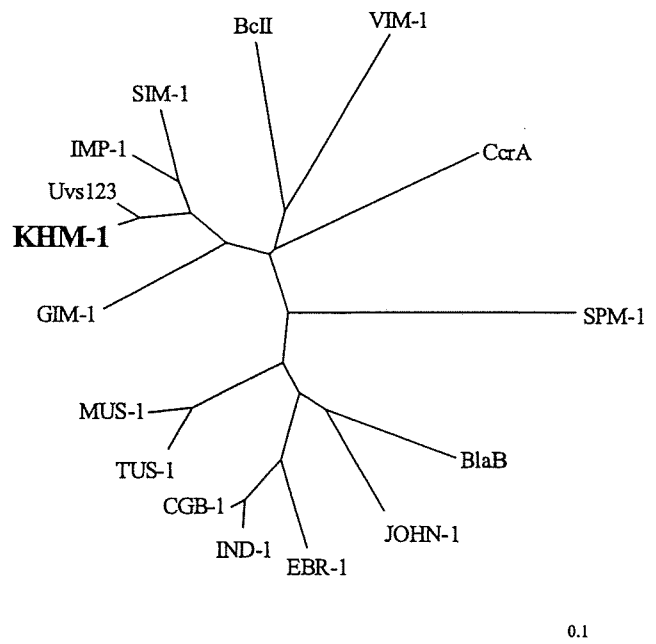


FIG. 1. Dendrogram showing the similarity of KHM-1 to other MBLs. KHM-1 and MBLs from a variety of organisms were tested. The dendrogram was created with the ClustalW program. Branch lengths correspond to the number of amino acid exchanges of the following MBL proteins (GenBank accession numbers, source organism) of BcII (P04190, from *Bacillus cereus*), BlaB (CAA65601, from *Elizabethkingia meningoseptica*), CcrA (P25910, from *Bacteroides fragilis*), CGB-1 (AAL55263, from *Chryseobacterium gleum*), EBR-1 (AAN32638, from *Empedobacter brevis*), GIM-1 (CAF05908, from *Pseudomonas aeruginosa*), IMP-1 (AAB30289, from *Serratia marcescens*), IND-1 (AAD20273, from *Chryseobacterium indologenes*), JOHN-1 (AAK38324, from *Flavobacterium johnsoniae*), MUS-1 (AAN63647, from *Myroides odoratimimus*), SIM-1 (AAX76774, from *Acinetobacter baumannii*), SPM-1 (CAD37801, from *P. aeruginosa*), TUS-1 (AAN63648, from *Myroides odoratus*), Uvs123 (AAP70377, from uncultured bacterium), and VIM-1 (CAB46686, from *P. aeruginosa*).

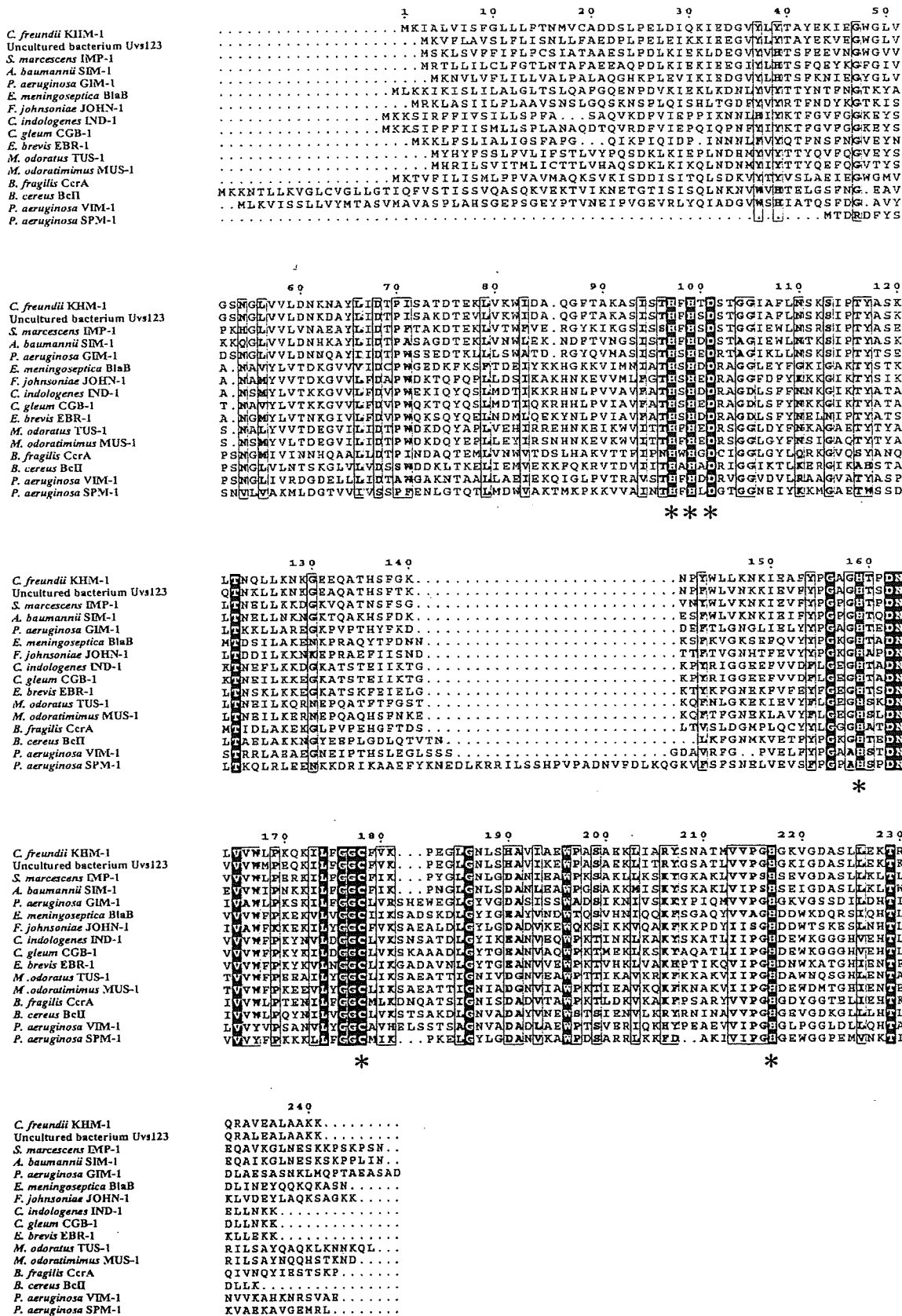


FIG. 2. Multiple-sequence alignments of the amino acid sequence of KHM-1 from *Citrobacter freundii* isolate KHM243 with those of other MBLs. The sequence sources are the same as those indicated in the legend to Fig. 1. Sequence comparison was performed by aligning the protein amino acid sequences by use of the ClustalW program (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>). The residues known to be involved in metal binding are indicated by asterisks. Identical residues are shaded.

TABLE 2. Kinetic parameters of β -lactamase KHM-1 with various substrates

Substrate	K_m (μM) ^a	k_{cat} (s^{-1}) ^a	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Penicillin G	1,340 \pm 56	23 \pm 0.9	1.7 \times
Ampicillin	978 \pm 111	19 \pm 2	1.9 \times
Cephaloridine	4.4 \pm 0.95	686 \pm 12	1.6 \times
Cefoxitin	81 \pm 4	1,178 \pm 164	1.4 \times
Cefotaxime	13 \pm 1.5	2,181 \pm 208	1.7 \times
Ceftazidime	8 \pm 0.4	118 \pm 3	1.5 \times
Moxalactam	71 \pm 8	2,794 \pm 260	3.9 \times
Aztreonam	— ^b	—	—
Meropenem	12 \pm 3	0.4 \pm 0.015	3.3 \times
Imipenem	268 \pm 53	15 \pm 3	5.6 \times

^a The K_m and k_{cat} values represent the means of three independent experiments \pm standard deviations.

^b —, no hydrolysis was detected under conditions with a substrate concentration of up to 1 mM and an enzyme concentration of up to 840 nM.

der the experimental conditions adopted. This activity inhibited by EDTA but was recovered by addition of Z (data not shown). The kinetic parameters, including K_m , k_{cat} and the k_{cat}/K_m ratio, were determined for several different β -lactams (Table 2). Relatively higher values of the k_{cat} ratio ($>10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), as a result of low values of K_m and high values of k_{cat} , were observed with the cephalosporins (cephaloridine, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, and moxalactam); and lower values of the k_{cat}/K_m ratio ($<10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) were observed with penicillin G, ampicillin, meropenem, and imipenem.

During 1997 and 1998, 104, 13, and 5 clinical isolates of *freundii*, *C. koseri*, and other *Citrobacter* spp., respectively, were collected in the hospital and were screened for imipenem resistance. Of these, four isolates of *C. freundii* showed reduced susceptibilities to imipenem (MICs, $>8 \mu\text{g/ml}$). However, $bla_{\text{KHM-1}}$ was not detected in any of these isolates except the one from the patient infected with strain KHM243. A laboratory-based survey of other isolates of the family *Enterobacteriaceae* in progress to detect $bla_{\text{KHM-1}}$.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence data for $bla_{\text{KHM-1}}$ and its flanking region from 774 bp upstream to 806 bp downstream reported here have been deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ databases under accession number AB443628.

This study was supported in part by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (grants H18-Shinko-011, H19-Shinko-011, H20-Shinko-011).

We thank M. Nakano (Jichi Medical School, Tochigi, Japan) for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- Arakawa, Y., N. Shibata, K. Shibayama, H. Kurokawa, T. Yagi, H. Fujii, and M. Goto. 2000. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* 38:40–43.
- Bush, K. 2001. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 32:1085–1089.
- Castanheira, M., M. A. Toleman, R. N. Jones, F. J. Schmidt, and T. R. Walsh. 2004. Molecular characterization of a β -lactamase gene, $bla_{\text{GIM-1}}$, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4654–4661.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Franceschini, N., B. Caravelli, J. D. Docquier, M. Galleni, J. M. Frère, G. Amicosante, and G. M. Rossolini. 2000. Purification and biochemical characterization of the VIM-1 metallo- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3003–3007.
- Gilmour, M. W., N. R. Thomson, M. Sanders, J. Parkhill, and D. E. Taylor. 2004. The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid* 52:182–202.
- Inoue, M., J. Itoh, and S. Mitsuhashi. 1983. pMS76, a plasmid capable of amplification by treatment with chloramphenicol. *Plasmid* 9:86–97.
- Jacoby, G. A., and L. S. Munoz-Price. 2005. The new β -lactamases. *N. Engl. J. Med.* 352:380–391.
- Kado, C. I., and S. T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365–1373.
- Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and G. M. Rossolini. 1999. Cloning and characterization of bla_{VIM} , a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1584–1590.
- Lee, K., J. H. Yum, D. Yong, H. M. Lee, H. D. Kim, J. D. Docquier, G. M. Rossolini, and Y. Chong. 2005. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, $bla_{\text{SIM-1}}$, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4485–4491.
- Levesque, C., L. Piche, C. Larose, and P. H. Roy. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185–191.
- Liebert, C. A., R. M. Hall, and A. O. Summers. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:507–522.
- Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, and T. Iida. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholera*. *Lancet* 361:743–749.
- Nakamura, M., S. Sato, T. Ohya, A. Suzuki, and S. Ikeda. 1985. Possible relationship of a 36-megadalton *Salmonella* Enteritidis plasmid to virulence in mice. *Infect. Immun.* 47:831–833.
- Ochman, H., A. S. Gerber, and D. L. Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:621–623.
- Osano, E., Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, and N. Kato. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:71–78.
- Rasumussen, B. A., and K. Bush. 1997. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:223–232.
- Sekiguchi, J., T. Asagi, T. Miyoshi-Akiyama, T. Fujino, I. Kobayashi, K. Morita, Y. Kikuchi, T. Kuratsuji, and T. Kirikae. 2005. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and its $aac(6')$ -*Iae* gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3734–3742.
- Taito, R. C., H. Rempel, R. L. Rodriguez, and C. I. Kado. 1985. The aminoglycoside-resistance operon of the plasmid pSa: nucleotide sequence of the streptomycin-spectinomycin resistance gene. *Gene* 36:97–104.
- Toleman, M. A., A. M. Simm, T. A. Murphy, A. C. Gales, D. J. Biedenbach, R. N. Jones, and T. R. Walsh. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial programme. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:673–679.
- Voget, S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K.-E. Jaeger, and W. R. Streit. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6235–6242.
- Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann. 2005. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18:306–325.
- Young, D., J. M. Bell, B. Ritchie, R. Pratt, M. A. Toleman, and T. R. Walsh. 2007. A novel sub-group metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia, abstr. C1-593, p. 75. Abstr. 47th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC.

医療施設における感染制御の組織化の現状

1 宮崎久義 みやざきひさよし

2 切替照雄 きりかえてるお

医療施設における院内感染症対策の現状について、全国515の医療機関（回答率43%）の協力を得て、アンケート調査を実施した。大多数の病院では院内感染防止委員会活動や院内感染防止のための講習会開催などの院内感染対策活動が実践されていることが明らかとなった。

一方、ICD（インフェクションコントロールドクター）やICN（感染管理認定看護師）などの資格を持った専門の医療従事者の普及、院内感染等のための専従時間を有する職員の設置、ICT（インフェクションコントロールチーム）の導入、特定感染症患者が発生した場合の対応マニュアルの普及、結核検査室での安全対策の普及等、医療機関が今後改善すべき点が明らかになった。

はじめに

平成15年度厚生労働科学特別研究事業による「国、自治体を含めた院内感染対策全体の制度設計に関する緊急特別研究」（主任研究者・小林寛伊）の中で大久保憲は

「医療施設における院内感染（病院内感染）の防止について」¹⁾を報告している。後にこの内容が厚生省健康政策局指導課長通知²⁾となり、日本における院内感染対策の指針となっている。この中で基本的推奨事項の第一

番目に記載されているのが「感染制御の組織化」であり、以下のよう

に記載されている。「病院長などが積極的に感染制御に関わり、感染対策委員会、感染対策チーム（ICT）などが中心となって、総ての職員に対して

組織的な対応と教育・啓発活動をしなければならない」

また、平成19年4月に改正医療法³⁾が施行され、国内の病院等医療施設に医療安全確保が義務づけられ、300床未満の中小医療施設も院内感染制御体制の整備が必須となった。

今回、このような感染制御の組織化が日本の医療施設でどの程度実施されているのか、および平成17年に改正された感染症法⁴⁾の周知がどのようになされているのかを明らかにする目的で、全国515の医療機関の協力を得てアンケート調査を実施した。

対象と方法

全国の病院1200施設を対象とした。内訳は、すべての特定、第1種および第2種感染症指定医療機関323施設、およびそれ以外の無作為に抽出した病院877施設であった。感染症指定病院323施設のうち、300床以上の病院は231施設、300床未満の病院は92施設であった。それ以外の病院877施設のうち、30



表 感染制御組織化の状況

		合計	感染症指定 医療機関	300床以上 の一般病院	300床未満 の一般病院	
施設数	合計	515	178	102	235	
	私立病院	249	19	46	184	
	公的病院	68	37	16	15	
	国公立病院	162	115	22	25	
	私立大病院	10	1	7	2	
	国公立大病院	6	2	3	1	
	その他	20	4	8	8	
アンケート	ICD (%)*	いる	44.7	78.1	59.8	12.8
		いない	55.3	21.9	40.2	86.4
	ICN (%)*	いる	17.1	29.8	33.3	0.4
		いない	82.9	69.7	66.7	98.7
	職員 (%)**	いる	30.3	33.7	42.2	22.6
		いない	69.7	65.7	56.9	72.8
	委員会 (%)	ある	98.8	99.4	100.0	97.9
		ない	1.2	0.6	0.0	1.7
	ICT (%)*	ある	57.9	83.1	71.6	32.8
		ない	42.1	16.9	28.4	66.0
ICTの平均構成	合計 (人)		11.8	12.4	10.1	
	医師		2.7	3.4	1.3	
	歯科医師		0.1	0.1	0	
	薬剤師		1.2	1.4	0.9	
	看護師		4.8	4.6	4.9	
	検査技師		1.3	1.3	0.9	
	病院事務員		0.9	0.9	1.1	
	その他		0.7	0.8	1.1	

* 300床未満の一般病院は感染症指定医療機関, 300床以上の一般病院との間で各々有意差あり (P<0.001).

** 院内感染等のための専従時間を有する職員

0床以上の病院は231施設、300床未満の病院は646施設であった。

アンケート調査用紙を平成19年2月1日に上記対象施設へ発送し、同年3月14日までに回答を得た。

アンケート参加施設は515 (回答率43%)で、その内訳は感染症指定医療機関178、それ以外の300床以上の病院102、300床未満の病院235であった。

感染症指定医療機関の内訳は、特定感染症指定医療機関3、第1種感染症指定医療機関13および第2種感染症指定医療機関162であった。アンケート参加施設のうち、結核指定医療機関が50含まれていた。内訳は、感染症指定医療機関31、300床以上の病院10、300床未満の病院9であった。

アンケート参加施設の平均病床数は295床(21~1200床)であった。感染症指定医療機関の平均病床数は415床(54~1116床)であった。それ以外の300床以上の病院の平均病床数は475床(300~1200床)で、このうち71施設が300床以上5

00床未満であった。300床未満の病院の平均病床数は127床(21~298床)で、このうち137施設が100床以上300床未満であった。

開設者別に見ると、私立病院249、公的病院68、国公立病院162、私立大学病院10、国公立大学病院6、その他20であった。

感染症指定医療機関の参加施設は同様に、私立19、公的37、国立115、私立大1、国公立大2、その他4であった。

300床以上の一般病院の参加施設は、私立46、公的16、国公立22、私立大7、国公立大3、その他8。一方の300床未満は、私立184、公的15、国公立25、私立大2、国公立大1、その他8であった。

アンケートでは、院内感染対策活動に関して質問した。

具体的には、ICD(インフルエンザ)の資格を持っている医師の有無、ICN(感染管理認定看護師)の資格を持っている看護師の有無、ICT(インフルエンザ)の

ロールチーム)の有無および構成メンバー、病原体取扱い主任者の有無および職種、院内感染等のための専従時間を有する職員の有無および職種、院内感染防止委員会の有無および開催頻度、院内感染防止のための講習会の実施に関して、一類感染症、二類感染症、四類および新型インフルエンザ患者が発生した場合の対応マニュアルの有無である。

統計解析は、 χ^2 乗検定を行った。P値が <0.05 を統計的に有意であると考えた。

結果

(1)院内感染対策活動

①ICD ICDの資格を持っている医師がいる病院は230施設(44.7%)であった。

内訳は、感染症指定医療機関では78.1%、300床以上の病院では59.8%で、300床未満の病院ではその割合が減少し、12.8%であった。

ICD資格保有者がいる病院では、1施設当たりのICD資格保

有者は平均2.1人であった。内訳は、感染症指定医療機関では平均2.3人、300床以上の施設では平均2.3人、300床未満の病院では平均1.3名であった。

②ICN

ICNの資格を持っている看護師がいる病院は88施設(17.1%)であった。

内訳は、感染症指定医療機関では29.8%、300床以上の病院では33.3%、300床未満の病院では1施設(0.4%)のみであった。ICN資格保有者がいる病院では、1施設当たりのICN資格保有者は平均1.3人であった。

③院内感染等のための専従時間を有する職員

院内感染等のための専従時間を有する職員がいる病院は156施設(30.3%)であった。

内訳は、感染症指定医療機関では33.7%、300床以上の病院では42.2%、300床未満の病院では22.6%であった。

院内感染等のための専従時間を有する職員がいる病院では、1施設当たり平均1.3人であった。

④院内感染防止委員会

509施設(98.8%)の病院で、院内感染防止委員会または同様の機能組織があった。委員会の開催頻度は94.1%の施設で、月1回開催していた。

⑤ICT

ICTがある病院は298施設(57.9%)であった。

感染症指定医療機関では83.1%、300床以上の病院では71.6%、300床未満の病院では有意に少なく、32.8%であった。ICTがある病院で、1施設当たりのICT構成人数は平均11.5名であった。

⑥院内感染防止のための講習会

職員全員を対象とした講習会を実施している病院は456施設(88.5%)、医療従事者のみを対象とした講習会を実施している病院が35施設(6.8%)であった。

院内感染防止のための講習会等を実施している456施設のうち、1カ月に1度以上の頻度で講習会等を開催している病院が24施設(5.3%)、2~3カ月に1度以上の頻度の病院が48施設(10.5%)



□□□文 献□□□

1) 大久保憲：医療施設における院内感染（病院感染）の防止について，平成15年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）分担研究報告書，国，自治体を含めた院内感染対策全体の制度設計に関する緊急特別研究．2) 平成17年2月1日付厚生労働省医政局指導課長通知：医療施設における院内感染の防止について，厚生労働省 < <http://www.mhlw.go.jp/topics/2005/02/tp0202-1.html> > 3) 医療法 < <http://www.mhlw.go.jp/bunya/shakaihoshou/iryouseido01/index.html> > 4) 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法） < <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/H10/H10HO114.html> >

%)、半年に1度以上の病院が304施設(66・7%)、1年に1度以上が97施設(21・3%)であった。施設の種類にかかわらず、多くの病院で、職員全員を対象とした講習会を半年に1度程度実施していた。

⑦ 一類感染症患者発生に備えた患者管理対応マニュアル

アンケート参加施設で、外来等で一類感染症等の特定の感染症患者が発生した場合の対応マニュアルが用意されている施設は、一類感染症に関しては30・9%、重症

急性呼吸器症候群(SARS)(二類)に関しては66・0%、結核(二類)に関しては85・0%、コレラ、赤痢、チフス、腸管出血性大腸菌(四類)に関しては、54・6%、新型インフルエンザについては40・4%であった。

結核やSARSに対するマニュアルは比較的多くの施設で用意されていたが、一類感染症や新型インフルエンザに関するマニュアルの用意されている病院は比較적으로少なかった。

感染症指定医療機関では、他の

病院と比較するとこれらの対応マニュアルを用意している施設の割合は高かった。特にSARSに関しては93・3%、結核に関しては93・8%、コレラ、赤痢、チフス、腸管出血性大腸菌に関して71・9%と高い一方、一類感染症に関しては30・9%とマニュアル整備は進んでいなかった。

考 察

全国の医療機関の協力を得て、院内感染症対策の実態に関するアンケート調査を実施した。

院内感染対策として、院内感染防止委員会活動や院内感染防止のための講習会開催等の活動が大多数の病院で実施されており、院内感染対策活動が全国の医療機関で実践されている実態が明らかとなった。

一方で、ICDやICNなどの資格を持った専門の医療従事者の普及、院内感染等のための専従時間を有する職員の設置、ICTの導入、特定感染症患者が発生した場合の対応マニュアルの普及、結核検査室での安全対策の普及等、

医療機関が今後改善すべき点が明らかになった。

特に、中規模・小規模病院では、専門の医療従事者がいなくICTがない病院の割合が非常に高く、このような施設で可能な院内感染対策活動のあり方を議論する必要がある。

本アンケートは、平成19年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)医療機関における感染症伝播に関する研究(主任研究者・宮崎久義)の事業の一環として実施した。

(1) 独立行政法人国立病院機構 熊本医療センター、(2) 国立国際医療センター

遺伝子検査—診断とリスクファクター

3. 遺伝子診断の実際

12) 感染症

(12) その他の薬剤耐性菌

切替 照雄

臨床検査

第51巻 第12号 増刊号 別刷

2007年11月30日 発行

医学書院

3. 遺伝子診断の実際

12) 感染症

(12) その他の薬剤耐性菌

切替照雄¹⁾

(KEYWORDS) 多剤耐性緑膿菌(MDRP), ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP), 多剤耐性肺炎球菌(MDRSP), LAMP 法

▶ 遺伝子診断の現状

これまで他項で述べられたように、病原微生物を同定するための多くの遺伝子診断法が開発され、その幾つかは既に臨床検査で日常業務の一部になってきている。特に、日常の検査で培養や顕微鏡検査が難しい病原体の診断に遺伝子診断が有効に使用されている。すなわち、ウイルスでは、サイトメガロウイルス(cytomegalovirus; CMV)、ヒトパピローマウイルス(human papillomavirus; HPV)や HIV (human immunodeficiency virus)などが、細菌では培養が比較的難しいかもしくは時間がかかる、クラミジア、レジオネラ、マイコプラズマ、ヘリコバクターピロリや結核菌等の遺伝子診断が導入されている。しかし、薬剤耐性菌の遺伝子診断の導入に関しては、必ずしも優先順位は高いとは言えない。このなかで、薬剤耐性結核菌の遺伝子診断に関してはその有効性がすでに広く認識されており、リファンピシン耐性遺伝子診断法(*rpoB*)が臨床検査試薬として実用化され、ピラジナミド耐性遺伝子診断法(*pncA*)も開発されて¹⁾、研究試薬として販売されている。その一方で、他の多くの薬剤耐性菌の遺伝子診断法の臨床応用は進んでいない。ただし、ゲノム型解析は別で、パルスフィールドゲル

電気泳動法などによる疫学調査は、薬剤耐性菌の感染対策のうえで大変有効な情報を提供している。検査機関では本技術を積極的に導入すべきである。

分子生物学の技術は、感染症の診断、治療および感染症対策における分子疫学調査においてますます重要な手法となり、従来の微生物検査法を大きく変えるであろうことは間違いない。薬剤耐性菌の診断の遺伝子診断においても、検査の簡便性、再現性、特異性、感度といった技術上の問題点を克服することが重要であるが、これらの技術にかかるコストや患者の治療にどのように有益であるのかなど議論の余地があろう。ダイレクトシークエンス法²⁾やDNAチップのような多くの情報が搭載でき、さらにコストのかからないような新たな診断技術の導入が必須であろう。本項では、ペニシリン耐性肺炎球菌、多剤耐性緑膿菌を中心にESBLsおよびメタロβラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の遺伝子診断、および緑膿菌の分子疫学に関して記載する。しかし、これらの遺伝子診断はいずれも研究レベルや疫学調査での使用にとどまっている。

▶ ペニシリン耐性肺炎球菌

MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)や多剤耐性緑膿菌など院内感染起因菌ばかりでなく、市中感染菌でも耐性菌が増加している。その中の代表的な菌がペニシリン耐性肺炎球菌 (Penicillin-resistant *Streptococcus pneumo-*

1) KIRIKAE Teruo 国際医療センター研究所感染症制御研究部

niae; PRSP)である。わが国で分離される肺炎球菌のほぼ50%がペニシリン耐性もしくは低感受性であり、PRSPの迅速遺伝子診断法は医療現場にとっても有用な検査法になるであろう。しかし、このような遺伝子診断法は実用化されていないが、PCRを用いたペニシリン耐性を同定する方法が報告されている。なお、肺炎球菌を同定するためのLAMP(loop-mediated isothermal amplification)法が開発され、簡便な遺伝子迅速診断法として臨床応用が期待されている。この標的遺伝子は、肺炎球菌特異的遺伝子でオートリジンをコードする*lytA*である。

PRSPのペニシリン耐性はペニシリン結合蛋白質(penicillin-binding protein; PBP)が構造変化し、ペニシリン結合親和性が低下することによってもたらされる。PBPはペニシリンをはじめとするβ-ラクタム剤の標的分子であり細胞壁合成酵素である。MRSAのペニシリン耐性も全く同様の機序であるが、耐性獲得の遺伝学的手法が全く異なる。MRSAのペニシリン耐性は、本来黄色ブドウ球菌には存在しないPBP(PBP2')をコードする遺伝子(*mecA*)が動く遺伝因子であるSCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*)上にあり、この遺伝因子によって運ばれる。一方、肺炎球菌のPBPの変異は他の口腔に常在する連鎖球菌属などPBP遺伝子との相同組換えによって生じる。口腔内連鎖球菌はペニシリンに自然耐性で、これらのPBP遺伝子が肺炎球菌に取り込まれると、肺炎球菌のPBP遺伝子と相同組換えを起こして、染色体上にキメラ状の新しいPBP遺伝子が誕生する。MRSAの遺伝子診断では*mecA*の有無を検出する。これに対して、PRSPの遺伝子診断はPBPをコードする*pbp*遺伝子の変異を検出することになる。

肺炎球菌では6種類のPBP(PBP1A, 1B, 2A, 2B, 2X, および3)が存在し、このうちPBP1A, 2Bおよび2Xのアミノ酸変異がβ-ラクタム剤耐性に大きく関与している。このほかにもPBP2Aも関与している可能性が示唆されている。先に述べたように肺炎球菌では薬剤耐性感受性にかかわらずモザイク遺伝子が生じている。β-ラクタム剤感受性株と耐性株の遺伝子配列を比較することで、薬剤耐性に関与する変異を同定

することができる。Ubukataら³⁾は、臨床分離株の*pbp*遺伝子解析の結果をもとに、*pbp1a*, *pbp2x*および*pbp2b*遺伝子内の薬剤感受性に関与する領域でプライマーのセットを設計し、PCRによるβ-ラクタム剤薬剤耐性遺伝子診断法を開発した。このPCRは感受性株で増幅するが変異株では増幅しないか、もしくは異なった増幅産物ができる。このPCR診断法と薬剤感受性とを比較すると、*pbp2x*や*pbp2b*に単独の変異を持つもの、*pbp2x*および*pbp2b*または*pbp1a*および*pbp2x*の2遺伝子に同時に変異があるものは、中等度耐性を示す。さらに*pbp1a*, *pbp2x*および*pbp2b*の3遺伝子すべてに変異があるものは高度耐性を示すようになる。このように変異にパターンで薬剤耐性の程度が推定できる。このような感受性株の*pbp*遺伝子を増幅するPCR診断法とは逆に、薬剤耐性変異をもった薬剤耐性*pbp*遺伝子を増幅するPCR診断法も開発されている。

ペニシリン耐性株がさらにマクロライド耐性を獲得した多剤耐性肺炎球菌(multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*; MDRSP)が臨床で大きな問題となっている。マクロライド耐性遺伝子として、マクロライドの標的分子である23S rRNAのメチル化修飾酵素をコードする*ermB*遺伝子と薬剤を排出するMefA蛋白質をコードする*mefA*遺伝子が知られているが、これらを増幅するPCR診断法も開発されている。



多剤耐性緑膿菌

多剤耐性緑膿菌(multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP)とは、主要な抗緑膿菌剤に対して広く耐性を獲得した緑膿菌のことである。しかし、MDRPがどの抗菌薬に耐性なのかといった定義は国際的には大変曖昧で、2000年以降の論文をみても論文ごとにMDRPの定義が異なり、国際的に通用する基準づくりに必要性が提唱されている。日本では感染症法でフルオロキノロン、カルバペネム、アミノ配糖体の3系統の抗菌薬に耐性を獲得した緑膿菌による感染症を「薬剤耐性緑膿菌感染症」と定義し、5類感染症定点把握疾患に定められている。これは、検査室での判定基準も明確にされている(表)。また、国

際的学術論文にもこの定義を記載すれば、MDRPに関する議論ができる。したがって、当面のMDRPの監視には、この基準を使用すれば問題はないが、将来MDRPの進化や使用薬剤の変化に応じて、見直しが必要になるだろう。なお、厚生労働省科学研究費による多剤耐性緑膿菌に関する調査では、2006(平成18)年の緑膿菌分離総数あたりのMDRPの分離率は、全国平均で2.7%であった。「院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)」でも同様な結果である。

MDRPの薬剤耐性機序に関与する遺伝子は非常に多い。したがって、遺伝子診断法を開発する場合には特定の耐性遺伝子に標的を絞る必要がある。わが国で流行しているMDRP株に対する迅速遺伝子診断法の導入が必要であろうが、日常の臨床現場で利用されているものは今のところない。

MDRPにみられる主な薬剤耐性機序を以下に示す。フルオロキノロン系抗菌剤は、DNAジャイレースおよびDNAトポイソメラーゼIVのそれぞれAサブユニット(それぞれGyrAおよびParC)が標的分子である。GyrAの83Thrまたは87Asp残基に加えて、ParCの87Ser残基に変異が起るとフルオロキノロン系抗菌剤に高度耐性になる。また、MexA-MexB-OprMやMexX-MexY-OprMの排出システムの高発現も、キノロン耐性の機構に関連している。

カルバペネム系抗菌剤の耐性には、外膜ポーリン蛋白質OprDの減少、メタロβ-ラクタマーゼ産生が主に関与している。OprDが減少することで薬剤の外膜通過を抑制することに加えて、メタロβ-ラクタマーゼ産生を産生することで薬剤を分解し不活性化する。わが国では、IMP-1型、IMP-2型やVIM-2型メタロβ-ラクタマーゼが検出される。

アミノ配糖体の耐性には、アミノ配糖体修飾酵素産生が主に関与している。このような酵素には、アミノ配糖体アセチル転移酵素(AAC)、アミノ配糖体アデニル転移酵素(AAD/ANT)、アミノ配糖体リン酸化酵素(APH)などアミノ配糖体を修飾し不活化する酵素が知られている。最近、Arakawaら⁴⁾は、アミノ配糖体の標的分子である16S rRNAをメチル化する酵素16S rRNA

表 感染症法によるMDRPの定義(検査室での判断基準)

<p>以下の3つの条件をすべて満たした場合</p> <ul style="list-style-type: none"> ・イミペネムのMIC, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ または、イミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が13 mm以下 ・アミカシンのMIC, $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ または、アミカシンの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が14 mm以下 ・シプロフロキサシンのMIC, $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ または、シプロフロキサシンの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が15 mm以下

メチラーゼ産生緑膿菌を発見している。この菌はあらゆるアミノ配糖体に高度耐性になっている。

上記に述べた遺伝子、メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子や16S rRNAメチラーゼ遺伝子、アミノ配糖体遺伝子を検出するための、LAMP法やPCR法が報告されているが、MDRPの定義の複雑さと耐性遺伝子の種類の多さから、MDRPすべてを検出する遺伝子診断法はこれまでにない。

われわれは、MDRP院内感染多発事例の解析から、この事例の原因となったMDRP株を同定した。このMDRP株はほとんどの抗緑膿菌薬に高度耐性で、IMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子や新規のアミノ配糖体アセチル転移酵素(AAC)遺伝子をもっている⁵⁾。次いでこの株の周辺地域の医療施設への広がりを調査した。その結果、この菌株が同県内の主要な医療施設に伝播していること、これらの施設で分離されているMDRPがすべてにこの菌株に由来していることがわかった⁶⁾。さらに現在、この株が全国の医療施設にも伝播しているのか検討中である。その予備調査の段階であるが、少なくとも関東と東北地方ではこのMDRP株が流行していることがわかってきている。そこで、この菌株を同定するためのこの菌株固有のAAC遺伝子を標的としたLAMP法を開発した⁶⁾。このようにMDRPの場合は、特定の菌株に焦点を絞った遺伝子診断法の開発が必要であろう。

文 献

- 1) Sekiguchi J, Nakamura T, Miyoshi-Akiyama T, et al: Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 45: 2802-72802, 2007

- 2) Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, et al : Detection of multi-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 45 : 179-192, 2007
- 3) Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, et al : Identification of penicillin and other β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Infect Chemother 3 : 190-197, 1997
- 4) Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al : Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet 362 : 1888-1893, 2003
- 5) Sekiguchi J, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, et al : Characterization of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain caused an outbreak in a neurosurgery ward and its integron-located *aac(6)-Iae* gene cassette encoding a new aminoglycoside acetyltransferase. Antimicrob Agents Chemother 49 : 3734-3742, 2005
- 6) Sekiguchi J, Asagi T, et al : Outbreaks of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. J Clin Microbiol 45 : 979-989, 2007



Q 熱(コクシエラ症)

Q 熱は細胞内寄生菌であるコクシエラ菌(*Coxiella burnetii*)の感染に起因する動物由来感染症であり、インフルエンザ様上気道炎、肺炎、不明熱、肝炎など多彩な病型を呈する予後良好な熱性疾患である。本症の診断に際しては、病原体の分離が事実上困難であり、また、国内発症例では抗体価の上昇には時間を要する症例が多いことから PCR 法が有力な補助診断法となる。16SrRNA, COM1, ICD, SOD など多数の標的遺伝子が異なる PCR 系が報告されているが、筆者らは感度と再現性に優れた COM1 遺伝子増幅系を第一選択として多用している。血液、喀痰、咽頭粘液、気管支肺胞洗浄液、組織標本などの各種急性期患者検体を用いてコクシエラ遺伝子断片の検出が可

能である。患者検体以外では動物由来の血液成分、排泄物、分泌物も検査対象となるため感染症の診断と同時に感染源となった保菌動物の検索も可能である。さらには生乳など食品成分をサンプルとした検討結果も報告されている。実際には動物由来検体では single PCR で陽性が確認される場合もあるが、患者検体からの検出を試みる際にはほとんどの場合は nested PCR が必要となる。肺炎症例における PCR 検索時の陽性率は気道検体のほうが血液検体よりは確率的には明らかに高いが、マイコプラズマ肺炎のように極めて高率に陽性化するものではない。したがって検出頻度を高めるためにはやはり良質の気道検体採取、血液や胸水、尿など気道外検体の PCR も併用するなどの対応が必要となる。

(坂総合病院呼吸器・感染症・科長 高橋 洋)
(東北大学加齢医学研究所抗感染症薬開発研究部門・
教授 渡辺 彰)

プリオン病予防のための手術器械の新しい滅菌法

大久保 憲

新しい医療技術



プリオン病予防のための手術器械の新しい滅菌法

大久保 憲*

要旨：クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease ; CJD) の疑いのある患者の診療に際しては、感染性の高い組織に対して注意が必要である。整形外科領域の手術では、特に変異型 CJD (variant CJD) における脊椎の手術で問題となる。CJD プリオンの感染性不活性化においては、① pH 11 以上のアルカリ洗浄剤を用いてウォッシュャディスプレイクタによる洗浄後にプリバキューム式高圧蒸気滅菌 134℃, 8~10 分, ② 適切な洗浄剤による洗浄後にプリバキューム式高圧蒸気滅菌 134℃, 18 分, ③ アルカリ洗浄剤による洗浄後に過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌 2 サイクル, などの方法が推奨されている¹⁾²⁾。手術器械等の滅菌に際しては、それに先立つ洗浄を効果的に行って、汚染物を可能な限り除去しておくことが原則である。

I. クロイツフェルト・ヤコブ病

クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease ; CJD) の原因である蛋白性の病原体をプリオンと名づけたのはプルシナー (1982 年) である。さらに、牛海綿状脳症としての狂牛病 (bovine spongiform encephalopathy ; BSE ; i.e. mad cow disease) が英国で初めて確認されたのは 1986 年であり、それはプリオン病であることは周知であるが、その BSE 由来のプリオン病が牛の組織を食用とすることでヒトにも感染することが明らかとなり (1996 年)、諸外国では新しい変異型 CJD (variant CJD ; vCJD) として多くの患者が発生している。

* Takashi OKUBO, 東京医療保健大学大学院, 感染制御学

New sterilization methods for prevention of prion disease from surgical instruments

Key words : Creutzfeldt-Jakob disease, Prion, Variant CJD

ヒトのプリオン病は古典的 CJD などの孤発性プリオン病, 家族性プリオン病, 感染性プリオン病に分類される。ヒトのプリオン病の約 80% を占める孤発性プリオン病の発生頻度は 100 万人に 1 人程度である。また、感染性プリオン病はクルー (Kuru) 病, 医原性 CJD, vCJD に細分される。

CJD はヒトにおける伝播性海綿状脳症 (transmission spongiform encephalopathy ; TSE) の中で最も流行している疾患として分類されている。このプリオン蛋白がヒトからヒトへ感染することは、脳硬膜移植により CJD の発症をみることから明らかである。感染型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) は、蛋白分解酵素により消化されず、界面活性剤を含む溶媒にも溶解しない病原体である。

vCJD が外科手術などにより伝搬した報告は未だないものの、潜伏期にある無症状の患者から血液や消化管内視鏡検査などを介して伝搬することが危惧される。

整形外科手術で脊髄に達する手術や、脳神経外

科手術で硬膜に侵入する手術などに使用した手術器械に対して、患者の示す症状に少しでもCJDを疑う所見があれば、プリオン病も考慮した確実な不活性化処理を行う必要がある。

vCJDの特徴は発症年齢が若いこと、失調症が顕著に表れて神経症状が比較的早期に始まり、脳波の周期性の放電が欠如することなど、従来のCJDとはっきり区別できることが特徴である。プリオン病は、ヒトのみならず動物にも発生する人獣共通感染症である。

医源性CJDは、硬膜移植術後、ヒト死体由来の成長ホルモンなどの投与後、角膜移植術後、脳神経外科手術を介して発生したものである。今までのところ脳神経外科手術に関連して発生したと考えられ、その状況がある程度解明できる症例は4症例報告されている。いずれも欧州から報告された1980年以前の症例である。感染の機会となった脳神経外科手術から15～28カ月後に発症している。

これらの症例のうち、フランスから報告された1症例は手術器械による感染の可能性が高いと考えられる。手術器械には乾熱滅菌法が行われていた。残りの3症例は英国から報告された1950年代の症例である。脳神経外科手術を介して感染したと推測されるものの手術器械の処理方法は不明であり、因果関係も明白ではない³⁴⁾。

vCJDは、若年発症などの古典的CJDとは異なる様々な特徴を有する。たとえば、組織の感染性においては、中枢神経系組織や眼組織以外に扁桃、リンパ節、脾臓、虫垂にも組織の感染性を認める。さらに、神経症状の発生前のvCJD患者の虫垂から感染型プリオン蛋白質が検出されたことや、輸血により感染したと推測されるvCJD患者が報告されている。

II. CJDを対象とした器材の洗浄

器材の洗浄はCJD対応においても最も重要な処理である^{5)~10)}。洗浄を十分に行えば、手術器械に付着したプリオン蛋白質の大部分を機械的に除去しうる。特に、pH 11以上のアルカリ性洗浄剤で処理した場合に最も有効な洗浄効果が得られる。

アルカリ性洗浄剤の感染型プリオン蛋白質に対する除去効果については、洗浄剤のpH値、反応温度、反応時間などが関与していることが示唆されている。

手術器械の洗浄に関して、①洗浄後にピロジェンなどが残留しないこと、②内視鏡外科手術器械などの管腔内を洗浄するのは困難であること、③器械の表面の残留蛋白質に134℃などの高温環境が加わると強固に固定されることなどに留意しなければならない。そのために高圧蒸気滅菌を行う前に十分に洗浄することが大原則である。

III. CJD対応の滅菌法^{11)~26)}

プリオンの感染性不活性化は、実験動物を用いて50%致死量 lethal dose を基準 (LD₅₀:プリオン実験ではLD₅₀は50%感染量 infectious dose [ID₅₀] に等しい) にした log₁₀ reduction (reduction factor; RF) で評価できる。

プリバキューム式高圧蒸気滅菌法は最も信頼されるプリオンの感染性不活性化処理法であり、log₁₀ reduction (RF) が5より大きい数字を示す。以前広く使用されていた重力加圧脱気式高圧蒸気滅菌器では、空気排除が不十分なため、滅菌効率が悪い。現在では医療現場でこの重力加圧脱気式高圧蒸気滅菌器は、ほとんど使用されていない。

重力加圧脱気式高圧蒸気滅菌器を使用する場合には、空気除去が十分適切に行われて、かつ滅菌時間を延長する必要がある。この場合には、滅菌時間はメーカーの指示に従って、滅菌器の特性に基づき適宜延長しなければならない。ハイスピード滅菌器などとして使用されている卓上型フラッシュ滅菌器は、滅菌精度からみてその使用は避けなければならない。

熱水洗浄消毒器であるウォッシュャデイスインフエクタ (WD) は、有効な洗浄効果が期待できる。WDが用いられない場合は、通常の洗浄にて4 log₁₀ reduction 程度の効果が得られる。その後、プリバキューム式高圧蒸気滅菌器にて134℃、18分間の滅菌が行われれば、プリオンの不活性化が達成できる。pH 11以上のアルカリ性洗浄剤を使用すれば、1.6v/v%, 43℃、15分浸漬および0.8v/

v%, 43°C, 7.5分浸漬にて reduction factor (RF) 5.5以上を得ることが可能である。この場合, pH 11以上のアルカリ性洗剤はアルミニウムなどの素材を腐食する場合があります, 素材との適合性に留意しなければならない。

最近では, アルカリ性洗剤による洗浄後に, 過酸化水素低温ガスプラズマの有効性が報告された。洗浄後に過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌器(100S®)を2サイクル実施すれば, プリオンの不活性化が確認されている。さらに2007年に本邦に導入された過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌器NX®タイプでは, 1サイクル滅菌においてもプリオンの不活性化が証明されている²⁷⁾。医療現場で使用されている非耐熱性医療機器に対する処理法として有用である。その他, 低温処理が必要な軟性/硬性内視鏡の内視鏡用カメラ, 一部の loan instrument, マイクロ器材などが対象となる。この場合にもアルカリ性洗剤と器材の素材との適応性に留意が必要である。

さらに, 過酸化水素蒸気(ガス) vaporized hydrogen peroxide による有用性も報告されている²⁸⁾。

プリオンの滅菌において, 3%ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate; SDS)で3~5分煮沸処理をする方法が紹介されているが, あらかじめ血液などの汚染を除去しないと, 血液が固まって落ちなくなるので前洗浄が必要である。また煮沸処理した際には沸騰による噴きこぼれがあり, 周辺汚染を防止する必要があるため, 臨床での使用は困難である。

IV. 手術における留意点

手術患者に対して, 臨床症状や疫学的にみてCJDの疑いがないかを確認しておく必要がある。

CJDの疑いのある患者では, 感染性の高い組織に対して留意しておかなければならない。特に変異型CJD(variant CJD)においては, 感染性が中等度からの高い確率とされる組織は脳, 脊髄, 硬膜, 視神経, 網膜, 扁桃, 脾臓, 血液, 虫垂といわれている(表1)²⁾。

整形外科領域の手術では, 脊椎の手術で問題が

生ずる。一方では, vCJDにおいては血液や消化管のリンパを介した感染の可能性も明らかにされている。

1. 手術スタッフへの対応

CJDと判明している患者もしくはCJDが疑われる患者の手術においては, 血液を介した感染に留意する。そのためには針刺し切創を起こさないように, 安全対策の施された鋭利器材の使用, 二重手袋の着用もしくは貫通しにくい構造のグローブの使用, 飛沫から顔面を保護できるゴーグルやフェイスシールドの使用, キャップやガウンも撥水性の素材とするなどの対応が求められる。

すべて単回使用(ディスポーザブル)とし, 使用後は感染性廃棄物として焼却処分されなければならない。

2. 手術室環境汚染

一般の手術においても同様であるが, 血液体液汚染から環境を保護する必要がある。血液等が飛散しないように留意した手術を行わなくてはならない。ガーゼや縫合糸を床に落とさないように, 器械台の決められた場所に保管して, 安全な方法で廃棄しなくてはならない。

3. 手術機器の管理

整形外科手術では, 手術操作上で多くの機器類が使用されるため, 術野外で使用する手術用顕微鏡や内視鏡器材などはあらかじめ防水性の素材で覆う必要がある。その他, ドリル, ドップラー, 超音波手術器械, レーザー機器などは, CJDと判明している患者もしくはCJDが疑われる患者の手術に使用した場合には, 一般の手術には使用できなくなることも考慮しておかなくてはならない。

4. 再滅菌すべき手術機器の処理

手術に使用された器材は, なるべく廃棄処分とするが, 滅菌して再使用すべきものは, 確実な洗浄が必要である。使用する洗剤はpH 11以上のアルカリ洗剤を使用する。アルカリ洗剤は高温になるほどその洗浄効果は高いが, 温度のみ上昇させると, 付着した有機物が器材に強固に固着する可能性もあり注意が必要である。当該施設で使用されているウォッシュャディスプレイインフェクタ

表 1 CJD プリオンに関するハイリスク手技²⁾

脳神経外科手術について

1. 硬膜を切開または穿刺する手技
2. 松果体, または下垂体周囲組織を切開して下垂体自体に接触する手技
3. 脳神経節を包む周囲組織を切開して神経節自体に接触する手技
4. 硬膜外の手術であっても術中操作により, 髄液の漏出が見られるなど, 結果的に硬膜を穿刺または切開した場合

眼科手術について

1. 視神経または網膜に関する手技
 - (1) 眼窩手術
 - (ア) 眼窩内容除去術
 - (イ) 眼球内容除去術
 - (ウ) 眼球摘出術 (角膜移植のためのドナー眼球摘出も含む)
 - (エ) 眼球摘出および組織または義眼台充填術
 - (オ) 眼窩内異物除去術, 眼窩内腫瘍摘出術および眼窩悪性腫瘍手術については術中操作により手術器具が視神経に接触した場合
 - (2) 網膜・硝子体手術
 - (ア) 黄斑下手術
 - (イ) 硝子体茎顕微鏡下離断術
 - (ウ) 増殖性硝子体網膜症手術
 - (エ) 網膜復位術
 - (オ) その他の網膜硝子体手術において術中操作により手術器具が網膜に接触した場合

整形外科手術について

1. 硬膜を穿刺または切開する手技
2. 脊髄後根神経節を包む周囲組織を切開して神経節自体に接触する手技
3. 硬膜外の手術であっても術中操作により, 髄液の漏出が見られるなど, 結果的に硬膜を穿刺または切開した場合

その他の手術について

1. 硬膜を穿刺または切開することにより内部のハイリスク組織に接触する手技

の日常的洗浄条件にて行えばよい。滅菌が不十分な器材は, 廃棄できなければその後は CJD 専用機器とすべきである。

非耐熱性の器材は, 低温での洗浄後に過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌を行えば, CJD プリオンの不活性化が期待できる。

文 献

- 1) 小林寛伊ほか: CJD プリオンの不活性化—手術医療の実践ガイドライン (日本手術医学会編). 日本手術会誌 29(Suppl): S69—S71, 2008
- 2) 厚生労働省医政局指導課長, 健康局疾病対策課長: 「プリオン病感染予防ガイドライン (2008年版) 要約」について. 平成 20 年 9 月 12 日医政指発第 0912001 号
- 3) Will RG et al: Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol

45: 235—238, 1982

- 4) Nevin S et al: Subacute spongiform encephalopathy; a subacute form of encephalopathy attributable to vascular dysfunction. Brain 83: 519—564, 1960
- 5) Vesley D et al: Microbial bioburden in endoscope reprocessing and an in-use evaluation of the high-level disinfection capacities of Cidex* PA. Gastroenterol Nurs 22: 63—68, 1999
- 6) Alfa MJ et al: Worst-case soiling levels for patient-used flexible endoscopes before and after cleaning. Am J Infect Control 27: 392—401, 1999
- 7) Chu N et al: Natural bioburden levels detected on flexible gastrointestinal endoscopes after clinical use and manual cleaning. Gastrointest Endosc 48: 137—142, 1998
- 8) Hanson PJV et al: Contamination of endo-

- scopes used in AIDS patients. *Lancet* ii (8654) : 86–88, 1989
- 9) Vesley D et al : Significant factors in the disinfection and sterilization of flexible endoscopes. *Am J Infect Control* **20** : 291–300, 1992
 - 10) Hanson PJV et al : A study of glutaraldehyde disinfection of fiberoptic bronchoscopes experimentally contaminated with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Hosp Infect* **22** : 137–142, 1992
 - 11) 小林寛伊 : 手術と Creutzfeldt-Jakob 病. *感染制御* **2** : 357–361, 2006
 - 12) National Institute for Clinical Excellence SCOPE_020904. Patient safety and reduction of risk of transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) via surgical instruments.
 - 13) WHO : Guidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies, World Health Organization, 2006
 - 14) Yan Z et al : Infectivity of prion protein bound to stainless steel wires ; a model for testing decontamination procedures for transmissible spongiform encephalopathies. *Infect Control Hosp Epidemiol* **25** : 280–283, 2004
 - 15) Baier M et al : Activity of an alkaline “cleaner” in the inactivation of the scrapie agent. *J Hosp Infect* **57** : 80–84, 2004
 - 16) World Health Organization : Practical Guidelines for Infection Control in Health Care Facilities, WHO, 2003
 - 17) SCENIHR (Science Committee of Energy Newly Identified Health Risks) : The safety of human-derived products with regard to variant Creutzfeldt-Jakob disease. SCEIHR, 2005
 - 18) Association for Professionals in Infection : APIC Text of Infection Control and Epidemiology, 2nd ed, APIC, 2005
 - 19) The Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP) and the Spongiform Encephalopathy Advisory Committee (SEAC) Joint Working Group : Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents ; Safe Working and the Prevention of Infection, UK Dept of Health, 1998
 - 20) Economics, Statistics and Operational Research, UK Department of Health : Assessing the Risk of vCJD Transmission via Surgery ; An Interim Review, 2005
 - 21) Fichet G et al : Novel methods for disinfection of prion-contaminated medical devices. *Lancet* **364**(9433) : 521–526, 2004
 - 22) Kimberlin RH et al : Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent ; guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J Neurol Sci* **59** : 355–369, 1983
 - 23) Taguchi F et al : Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Arch Virol* **119** : 297–301, 1991
 - 24) Taylor DM et al : Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol* **139** : 313–326, 1994
 - 25) Ernst DR et al : Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J Virol Methods* **41** : 193–202, 1993
 - 26) Fichet G et al : Investigations of prion infectivity assay to evaluate methods of decontamination. *J Microbiol Methods* **70** : 511–518, 2007
 - 27) Yan ZX et al : Low-temperature inactivation of prion protein on surgical steel surfaces with hydrogen peroxide gas plasma sterilization. *Zentr Steril* **16** : 26–34, 2008
 - 28) Fichet G et al : Prion inactivation using a new gaseous hydrogen peroxide sterilization process. *J Hosp Infect* **67** : 278–286, 2007

*

*

*

*

*