

Table 1. Primers used for PCR and sequencing.

Target and Primer	Sequence (5'-3')	Reference
Genes surrounding <i>qepA</i>		
IS26-1	5' - TTA CAT TTC AAA AAC TCT GC - 3'	[17]
IS26-2	5' - ATG AAC CCA TTC AAA GGC CGG - 3'	This study
tnpR-F	5' - CGA CAC TGC CGA TAT GAT CC - 3'	
tnpR-R	5' - CGG GCA ATA CTG AGC TGA TG - 3'	[18]
TEM-F	5' - ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA-3'	
TEM-R	5' - GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC -3'	[19]
rmtB-F	5' - CCC AAA CAG ACC GTA GAG GC -3'	
rmtB-R	5' - CTC AAA CTC GGC GGG CAA GC -3'	This study
SP-1	5' - ATG CTG GCG ACG ATC CGC AC -3'	
SP-2	5' - CGG CGA AGG CAG CTA CGG CT -3'	[1]
qepA - F	5' - AGC AGC GCG CTG AAT CCA - 3'	
qepA - R	5' - CGA ACC CAG TGG ACA TAA - 3'	[2]
new qepA - F	5' - GCA GGT CCA GCA GCG GGT AG - 3'	
new qepA - R	5' - CTT CCT GCC CGA GTA TCG TG - 3'	This study
SP-3	5' - CAC ATC AGG GGG CAC GGT CG -3'	
Genes surrounding <i>qnrS1</i>		
LAP-F	5' - CAA TAC AAA GCA CAG AAG ACC - 3'	[10]
LAP-R	5' - CCG ATC CCT GCA ATA TGC TC - 3'	This study
LS-1	5' - TGC TCT CTT ACG GTT GCG AT - 3'	
LS-2	5' - GTC GTA CAC CGC AGG AAA AA - 3'	[7]
qnrS-F	5' - ACG ACA TTC GTC AAC TGC AA -3'	
qnrS-R	5' - TAA ATT GGC ACC CTG TAG GC -3'	This study
qS14-1	5' - ATA GGG GTA CTA CGC CGG AA - 3'	
qS14-2	5' - AGG CTC ATG ACC CAC CTT TC - 3'	This study
sea14	5' - GGT CTC CCC TGA TTT CTG GA - 3'	
YdaA	5' - AGC CAG TTT GAA CGA GCC TT - 3'	This study

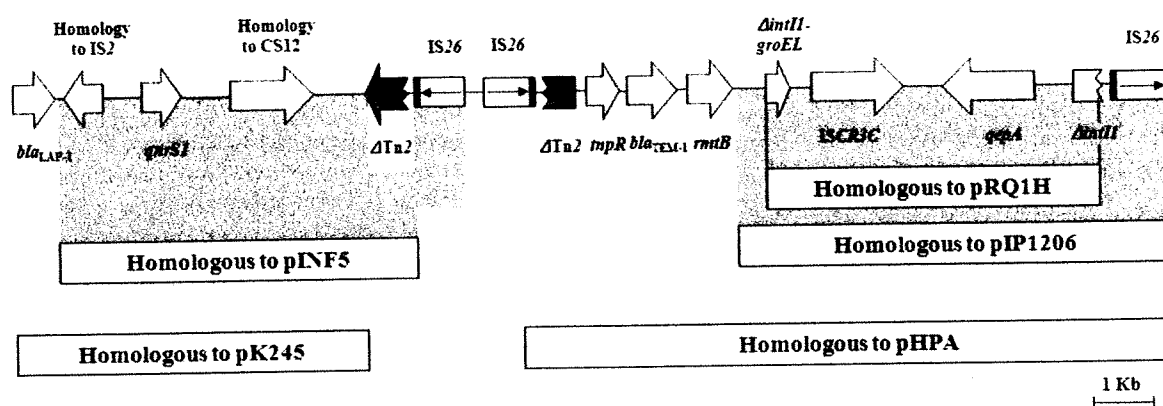


Fig. 1. Genetic environments of the *qepA*, *qnrS1*, and *bla_{LAP-1}* genes and comparison with other plasmids harbouring *qepA* or *qnrS1*. A distance scale is presented below the map. The reading frames are shown as arrows with the arrowhead indicating the direction of transcription. Plasmid pK245 is from *K. pneumoniae* [11], plasmid pINF5 is from *S. enterica* serotype Infantis [12], and plasmids pRQ1H, pIP1206 and pHPA are from *E. coli* [1,2,20].

Table 2. MICs of antimicrobial agents for donors, transconjugants, and the recipient.

Antimicrobials (breakpoints for susceptibility/resistance)	YS10	Transconjugate from YS10	YS11	Transconjugate from YS11	<i>E. coli</i> J53
Ciprofloxacin (1/4)	4	2	16	1	0.015
Nalidixic acid (16/32)	16	8	64	16	4
Piperacillin (16/128)	256	32	256	32	1
Cefazolin (8/32)	≥512	2	≥512	2	1
Cefuroxime (8/32)	128	8	64	8	4
Ceftazidime (8/32)	4	0.25	2	0.25	0.25
Cefepime (8/32)	0.125	0.06	0.06	0.06	0.03
Amikacin (16/64)	≥1,024	≥1,024	≥1,024	≥1,024	0.5

noteworthy that another quinolone resistance determinant, *qnrS1*, was again linked with a class A β -lactamase, *bla*_{LAP-1} in both strains. Moreover, all of them were co-transferred by conjugation. Liu et al [15] recently reported that 58.3% (28/48) of the *rmtB*-positive *E. coli* isolates harbored *qepA* gene, indicating a strong linkage between *qepA* and *rmtB*. In addition, IncF type plasmid is the second most frequent type of plasmid in *rmtB*-producing *Enterobacteriaceae* in Korea [16].

To our knowledge, this is the first report of *qepA* in *Enterobacteriaceae* other than *E. coli*, suggesting a probable intergeneric gene transfer. In a sampling from a wide geographic area in Korea (12 hospitals and 572 bacterial isolates), we found that there is currently a low prevalence (0.3%) of the plasmid-mediated fluoroquinolone efflux gene, *qepA* in *E. aerogenes*. While this is a fortunate circumstance for the moment, considering the effect of ISCR3C, strong linkage between *qepA* and *rmtB*, and the frequency of IncF type plasmid in *rmtB* producers, these organisms could become a greater nosocomial infection problem with appropriate foci of selective pressure. Continued build up of resistance in clinically relevant Gram-negative bacilli would pose serious challenges in our increasingly complex hospital system. It is important to continue to promote prudent and

limited use of antibiotics in all economic areas, including the health care system and the agricultural industry. Furthermore, it is important to have public health support to continue active surveillance of clinical *Enterobacteriaceae* isolates for plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes and the various other resistance determinants.

Acknowledgments

This work was supported in part by a grant from the Korea Food and Drug Administration in 2007 (FD07052). We thank the contributing laboratories that provided isolates for this study. We thank Jung Jun Park for technical assistance.

References

1. Périchon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2464-2469.
2. Yamane K, Wachino J, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3354-3360.
3. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical

- isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1564-1566.
4. Park YJ, Lee S, Yu JK, Woo KJ, Lee K, Arakawa Y. Co-production of 16S rRNA methylases and extended-spectrum beta-lactamases in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:907-908.
 5. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, sixth ed., Approved Standard M7-A6, CLSI, Wayne, PA, 2003.
 6. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3953-3955.
 7. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2872-2874.
 8. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins VKL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2006;63:219-228.
 9. Tenover F, Arbeit F, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-2239.
 10. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance *QepA2* from *Escherichia coli* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; Jul 21. [Epub ahead of print]
 11. Chen YT, Shu HY, Li LH, Liao TL, Wu KM, Shiau YR, Yan JJ, Su IJ, Tsai SF, Lauderdale TL. Complete nucleotide sequence of pK245, a 98-kilobase plasmid conferring quinolone resistance and extended-spectrum- β -lactamase activity in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3861-3866.
 12. Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Michael GB, Schwarz S. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS1* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:18-22.
 13. Kern WV. New plasmid-borne quinolone-resistance determinant in *Escherichia coli*. *Future Microbiol* 2007;2:473-475.
 14. Chong YP, Jun J, Yoon HJ, Kim ES, Lee S, Choi S, Woo JH, Jeong JY, KimYS. Prevalence of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme in *Enterobacteriaceae* isolated on blood cultures in Korea. In: *Abstracts of Forty-seventh Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, American Society for Microbiology, Chicago, 2007; pp C2-154.
 15. Liu JH, Deng YT, Zeng ZH, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, Chen ZL. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QepA*, *Qnr*, and *AAC(6')-Ib-cr* among 16S rRNA methylase *RmtB*-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2992-2993.
 16. Kang HY, Kim KY, Kim J, Lee JC, Lee YC, Cho DT, Seol SY. Distribution of conjugative-plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among amikacin-resistant *Enterobacteriaceae* isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediating dissemination of 16S rRNA methylase. *J Clin Microbiol* 2008;46:700-706.
 17. Kim J, Shin HS, Seol SY, Cho DT. Relationship between *bla_{SHV-12}* and *bla_{SHV-2a}* in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:261-267.
 18. Lee K, Yong D, Yum JH, Kim HH, Chong Y. Diversity of TEM-52 extended-spectrum β -lactamase-producing non-typhoidal *Salmonella* isolates in Korea. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:493-496.
 19. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, Arakawa Y, Chong Y. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:305-312.
 20. Poirel L, Cattoir V, Soares A, Soussy CJ, Nordmann P. Novel Ambler class A β -lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *QnrS1*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:631-637.



RESEARCH LETTER

A novel insertion sequence, IS1642, of *Mycobacterium avium*, which forms long direct repeats of variable length

Zhenyu Piao, Keigo Shibayama, Shigetarou Mori, Jun-ichi Wachino & Yoshichika Arakawa

Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

Correspondence: Keigo Shibayama, Department of Bacterial Pathogenesis and Infection control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan. Tel.: +81 42 561 0771; fax: +81 42 561 7173; e-mail: keigo@nih.go.jp

Received 1 September 2008; accepted 19 November 2008.

First published online 22 December 2008.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2008.01459.x

Editor: Roger Buxton

Keywords

insertion sequence; direct repeat; inverted repeat; transposase.

Introduction

The insertion sequence (IS) on a bacterial genome facilitates gene rearrangements, which could contribute to the evolution of the organism (Mahillon & Chandler, 1998). ISs are widely distributed in most microorganisms, including the *Mycobacterium* species. For example, genome sequence analysis revealed that the *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* strain K-10 contained 19 kinds of ISs, with 58 total copies in the genome (Li *et al.*, 2005). The genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv contained 56 loci with homology to ISs (Gordon *et al.*, 1999).

Bacterial ISs usually contain one or several ORFs, which encode enzymes such as transposases that catalyze the movement within the genome. ISs typically contain short terminal inverted repeat sequences (IRs), ranging from 10 to 40 bp. Upon insertion into the host genome, ISs are flanked on either side by short directly repeated sequences (DRs). The length of a direct repeat, which is usually a fixed characteristic of each IS, generally ranges between 2 and 14 bp (Mahillon & Chandler, 1998).

ISs are used as markers in restriction fragment length polymorphism studies for species typing and for molecular

Abstract

A new insertion sequence (IS), IS1642, was identified in a *Mycobacterium avium* strain isolated from a human patient. IS1642 had a size of 1642 bp and contained a single ORF encoding a probable transposase of 503 amino acid residues homologous (79% identity) to that of IS1549 found in *Mycobacterium smegmatis*. The IS1642 included imperfect inverted repeats (5'-cctgactttatca-3', 5'-tgataaaagtcggg-3') on its ends, and was flanked by direct repeats of variable length ranging from 5 to 161 bp. It was suggested that the IS1642 was widely distributed in many *M. avium* strains of human patients, and the Southern blot profile of IS1642 was very diverse among the strains examined. The transposition event of IS1642 was observed by *in vitro* repeated passages, showing that the IS1642 is actually a transposable element. In light of these characteristics, IS1642 could be a new useful marker when genotyping with high discrimination is required.

epidemiological purposes [e.g. IS6110 in *M. tuberculosis* (Otal *et al.*, 1991; Small & van Embden, 1994) and IS1245 in *M. avium* (Guerrero *et al.*, 1995; Pestel-caron & Arbeit, 1998; Ritacco *et al.*, 1998; van Soolingen *et al.*, 1998; Motiwala *et al.*, 2006)]. When isolates from different sources have few distinguishing phenotypic characteristics, the use of ISs as probes could enable powerful discrimination. On the other hand, because of their mobility, IS could be potential useful markers for identifying substrains or tracking the genetic drift (Hernandez Perez *et al.*, 1994; Laurent *et al.*, 2002).

In this study, we identified a novel IS, designated IS1642, which was flanked by unusually long, variable-length direct repeats, in *M. avium* clinical isolates. Here, we present molecular and genetic characterizations of this IS.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Mycobacterium avium clinical strains isolated from human patients were kindly provided by Dr K. Ogawa of NHO Higashi Nagoya National Hospital and Dr Matsumoto of the

Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, Japan. These strains were identified as the *Mycobacterium avium/intracellulare* complex by the *Mycobacterium* identification kit (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co. Ltd), and further identified as *M. avium* by PCR (Nishimori *et al.*, 1995). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* K-10 (BAA968), two *M. avium* strains (25291 and 15769), and two *M. intracellulare* strains (13950 and 25225) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Five *M. intracellulare* strains, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium abscessus*, and *Mycobacterium bovis* BCG Japanese strain were from our laboratory. The laboratory strain *M. tuberculosis* H37Rv was also included for analysis. These strains were cultured on Middlebrook 7H10 supplemented with 10% (v/v) OADC enrichment (BD) at 37 °C.

DNA manipulations

Mycobacterial genomic DNA was isolated as described (Pelicic *et al.*, 1997), with a minor modification. Bacterial cells were harvested and suspended in 1 mL of acetone. The cells were pelleted by centrifugation (10 min at 5000 g). The pellet was resuspended in 500 µL solution I (25% sucrose/50 mM Tris · HCl, pH 8.0/50 mM EDTA/500 mg mL⁻¹ lysozyme) and incubated overnight at 37 °C. Then 500 µL of solution II (100 mM, Tris · HCl, pH 8.0/1% SDS/400 µg mL⁻¹ proteinase K) was added, and the samples were incubated for 5 h at 55 °C. Genomic DNA was extracted from the lysate using the bacteria genomicPrep Kit (GE Healthcare).

PCR and nucleotide sequencing

The primers used in this study are listed in Table 1. PCRs were performed with Phusion high-fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Thermal cycling conditions comprised preincubation at 98 °C for 30 s, followed by 30 cycles at 98 °C for 10 s, at 68 or 55 °C for 30 s, and at 72 °C

for 2 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. For examination of direct repeats, genome DNA was digested by PvuII or NotI, and self-ligated. The direct repeat region was amplified by PCR with the primer set IS1642-DR1 and IS1642-DR2 (Table 1), which match the ends of IS1642 and face the outwards. Two amplified products were obtained, and the nucleotide sequences were determined by sequencing. For sequencing, PCR products were purified using the GFX PCR purification kit (GE Healthcare). Sequencing was carried out using the Big Dye DNA sequencing kit (Applied Biosystems) and the ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences were analyzed by GENETYX-MAC software, version 14.0.1 (Genetyx Co., Tokyo, Japan).

Southern blot analysis

Genome DNA was digested with restriction endonuclease PvuII (New England Biolabs), which had no recognized sites in the IS1642 sequence. The digested DNA samples were electrophoresed on a 0.8% agarose gel. DNA fragments were transferred onto a nylon membrane and hybridized with a digoxigenin-labelled probe prepared using the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) with primer sets IS1642-3F and IS1642-3R designed to amplify a 515-bp portion of IS1642. Hybridized bands were visualized by chemiluminescence detection (Labeling and Detection Starter Kit II, Roche).

Promoter activity analysis

The entire IS1642 region was amplified by PCR with the primer set PIS-2 and PIS-3 (Table 1), and cloned upstream of a promoterless green fluorescent protein (GFP) gene on a cloning vector pVVI6 (a kind gift from Dr Vissa). The plasmids were transformed into *Mycobacterium smegmatis* mc² 155, and the expression of these genes was assessed by measuring the fluorescence of GFP with a fluorescence plate reader (Perkin Elmer, Wallac 1420 ARVO MX).

Nucleotide sequence accession numbers

AB453386 is the GenBank accession number for the nucleotide sequence of the entire region of insertion element IS1642. The GenBank accession number for the nucleotide sequence of the region containing insertion element IS1642 and the 161-bp direct repeats is AB453387.

Results

Identification of new IS, IS1642

A new IS was identified in an *M. avium* strain isolated from a human patient. The IS was found 673 bp upstream of the start codon of the gene corresponding to the MAP0076 gene of the *M. avium* ssp. *paratuberculosis* K-10 genome. This

Table 1. List of primers used in this study

Primer	Sequence (5'–3')
IS1642-1F	TTGTGTAGGGCTGTGACCTG
IS1642-1R	ACGTAGGCTGTGGATGTTTG
IS1642-2F	TGACCTGTGTCTTCGGTTG
IS1642-2R	TGTGCTTGCCGGCTTGATAG
IS1642-3F	TCATCGAACCAGCAGCAAG
IS1642-3R	CACCACATCAGGTAACAAACG
IS1642-DR1	CTACCGTACCGTCACTATCC
IS1642-DR2	TCTTCACCGTGCGCACATAG
PIS-2	CGGGATCCCCGCCATTTCACTGAAACC
PIS-3	CCCAAGCTTGCGAACAAAAATCGACGCG

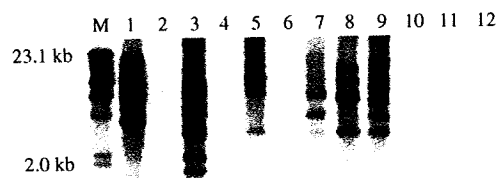


Fig. 2. Southern blot profile of IS1642 of *Mycobacterium avium* strains. M, molecular size marker, lambda HindIII. lanes 1–9, human *M. avium* isolates; lane 10, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* K-10; lane 11, *M. avium* ssp. *avium* ATCC25291; lane 12, *M. avium* ssp. *avium* ATCC15769. Numbers on the left indicate the sizes of the DNA marker.

respectively. The IS with the 5 bp direct repeat was found to be within the coding region of MAP2026 gene. The sequence flanking the 59 bp direct repeat sequence did not match with any gene in the database. We sought to find a conserved sequence at the insertion sites, but sequence specificity was not obvious among these three target sites.

Distribution of IS1642

The distribution of IS1642 among *M. avium* strains was examined by Southern blot analysis with the following strains: *M. avium* ssp. *paratuberculosis* K-10, *M. avium* ssp. *avium* ATCC25291, *M. avium* ssp. *avium* ATCC15769, and nine *M. avium* strains, isolated from different patients at NHO Higashi Nagoya National Hospital. The DNA bands were found in only some of the *M. avium* strains isolated from human patients, but not in *M. avium* ssp. *paratuberculosis* K-10, *M. avium* ssp. *avium* ATCC25291, and *M. avium* ssp. *avium* ATCC15769 (Fig. 2). The Southern blot profile indicated that the band patterns of IS1642 were very diverse and the copies were multiplied. *Mycobacterium intracellulare* ATCC13950, *M. intracellulare* ATCC25225, five *M. intracellulare* clinical isolates, and seven other mycobacterial species were negative for IS1642 on the Southern analysis profile (data not shown). The prevalence of IS1642 among *M. avium* strains was further examined with eight strains isolated from human patients at the Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases by PCR with the three sets of specific primers (primers IS1642-1F and IS1642-1R, IS1642-2F and IS1642-2R, IS1642-3F, and IS1642-3R) (Table 1). All strains were positive for IS1642 (data not shown), suggesting that IS1642 is widely distributed among *M. avium* clinical strains.

Mobility of IS1642

Because the Southern blot profile of IS1642 was very different among strains, we explored whether or not the IS1642 exhibits frequent mobility by examining changes in the Southern blot pattern during repeated passages *in vitro*. One *M. avium* clinical strain was streaked on a 7H10 agar

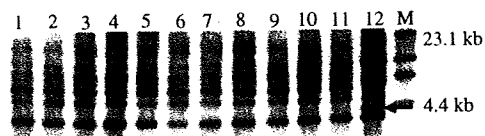


Fig. 3. Change in the Southern blot profile of IS1642 of the human *Mycobacterium avium* isolate by *in vitro* repeated passages. lane 1, original *M. avium* cells; lanes 2–11, *M. avium* cells subcultured once from 10 individual colonies from the original culture plate; lane 12, *M. avium* cells passaged 10 times from the original culture plate. M, molecular size marker, lambda HindIII. The additional band that appeared after the repeated passage is indicated by the arrow. Numbers on the right indicate the sizes of the DNA marker.

plate, and passaged 10 times. A single colony was used for inoculation at each passage. After the passages, genome DNA was extracted. For reference, 10 colonies were individually subcultured once from the initial culture plate and genome DNA samples were extracted. The genome DNA samples were subjected to Southern blot analysis. While the original cells and the cells of 10 colonies with a single subculture showed identical patterns, the passaged cells contained an additional band (Fig. 3), indicating that transposition of the IS occurred during the *in vitro* repeated culture.

Discussion

In this study, we discovered a new IS, IS1642, in *M. avium* clinical strains isolated from human patients. Our results showed that multiple copies of IS1642 are present in several *M. avium* strains. The deduced amino acid sequence of the ORF of IS1642 was highly homologous to the transposase of *M. smegmatis* IS1549 (Plikaytis *et al.*, 1998). IS1549 is an insertion element whose transposases exhibited homology to that of IS1623 and IS1634, and it was suggested that these transposases represent an emerging group in the IS4 family because they exhibit a characteristic lack of the typical conserved N3 region of IS4 family and yet possess unique N2 and N3 motifs (Vilei *et al.*, 1999; Alexander *et al.*, 2003). A notable feature of IS1549 and IS1634 is that they are flanked by unusual long direct repeats that may vary in length (Plikaytis *et al.*, 1998; Vilei *et al.*, 1999). The lengths of the direct repeats of these ISs range up to 500 bp, in contrast to most usual ISs flanked by short direct repeats of 2–14 bp. IS1642 found in this study also exhibited these characteristics. IS1642 contained the C1 region and unique N2 and N3 motifs, but not the N3 region of the IS4 family, suggesting that IS1642 belongs to this new group. IS1642 was flanked by direct repeats of variable lengths ranging up to 161 bp. Considering that IS1642 was homologous to the Iss, which form variable length direct repeats, it would be likely that the direct repeat sequences found in this study were actually created by IS1642. The actual range of lengths

of direct repeats may be larger as reported in other ISs. Because the homology level of the entire region of the amino acid sequence was relatively low among ISs of this group (e.g. 38% identity between IS1549 and IS1634), the conserved structures of the amino acid sequence might play an important role in the formation of the characteristic long direct repeats of variable lengths. There was no conserved sequence at the insertion sites among the three target sites, suggesting that the insertion events by IS1642 take place randomly on the genome.

To date, the advantage of formation of long, variable-length direct repeats is not well elucidated. While insertion with a long target duplication may decrease the likelihood of destroying essential genes at the target sites on the host genome, it would be expected that an insert flanked by long direct repeats could be easily removed by homologous recombination between the repeats. Nobusato *et al.* (2000) reported insertions with long target duplications in the restriction and modification enzyme genes of *Helicobacter pylori* strains. They considered that the long duplication may control the copy number of the genes, thus keeping expression of the genes at an appropriate level. Further studies are required to elucidate the significance of the long, variable-length direct repeats.

Our results suggested that IS1642 is widely distributed among *M. avium* clinical strains. In addition, the experiment of repeated passage suggested that IS1642 is indeed capable of frequent transposition within the genome. This is consistent with the observation that the Southern blot profile was very divergent among the strains tested. Considering this polymorphism, it would be rather inappropriate to use the Southern blot pattern of IS1642 as a genetic typing tool for classification of different clinical strains. Alternatively, genotyping by IS1642 could be useful to confirm the clonality of strains because it would enable high-precision discrimination.

IS elements reportedly often carry an outward-directed promoter sequence, bringing about a constitutive expression of downstream genes at insertion sites (Safi *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2004). IS1549 was found to show promoter activity (Plikaytis *et al.*, 1998). Because IS1642 was homologous with IS1549, we examined IS1642 for promoter activity. However, the expression of GFP was at an undetectable level. IS1642 would have no or very low outward-directed promoter activity, or the promoter sequence could be formed as a hybrid of the IS sequence and genome sequence at insertion sites, thus turning on the expression of otherwise silent genes on the genome, as reported by Szeverényi *et al.* (1996). It might also be possible that promoters of IS1642 could not be recognized by *M. smegmatis*.

IS1642 would be involved in the gene rearrangements on the genome, thus contributing to evolution of the organism, like many other ISs. Although *M. avium* is an opportunistic

pathogen, treatment is often very difficult once the infection is established, despite long-term administration of antibiotics. It may be possible that IS1642, which has a relatively high mobility, serves to facilitate establishment of chronic infection by adapting the phenotype including the pathogenicity and drug resistance of the organism for conditions at the focus of the infection *in vivo*.

Acknowledgements

We thank Dr K. Ogawa and Dr T. Matsumoto for providing *M. avium* clinical isolates. Collection of *M. avium* strains was supported by grant H18-Shinkou-Ippan-011, and analysis of the IS was supported by grant H19-Shinkou-Ippan-006, from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- Alexander DC, Jones JRW & Liu J (2003) A rifampin-hypersensitive mutant reveals differences between strains of *Mycobacterium smegmatis* and presence of a novel transposon, IS1623. *Antimicrob Agents Ch* **47**: 3208–3213.
- Gordon SV, Heym B, Parkhill J, Barrell B & Cole ST (1999) New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* **145**: 881–892.
- Gurrero C, Bernasconi C, Burki D, Bodmer T & Telenti A (1995) A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, IS a specific target for analysis of strain relatedness. *J Clin Microbiol* **33**: 304–307.
- Hernandez Perez M, Fomukong NG, Hellyer T, Brown IN & Dale JW (1994) Characterization of IS1110, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium*. *Mol Microbiol* **12**: 717–724.
- Laurent JP, Faske S & Cangelosi GA (2002) Characterization of IS999, an unstable genetic element in *Mycobacterium avium*. *Gene* **294**: 249–257.
- Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S & Kapur V (2005) The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *P Natl Acad Sci USA* **102**: 12344–12349.
- Mahillon J & Chandler M (1998) Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol R* **62**: 725–774.
- Motiwala AS, Li L, Kapur V & Sreevatsan S (2006) Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect* **8**: 1406–1418.
- Nishimori K, Eguchi M, Nakaoka Y, Onodera Y, Ito T & Tanaka K (1995) Distribution of IS901 in strains of *Mycobacterium avium* complex from Swine by using IS901-detecting primers that discriminate between *M. avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol* **33**: 2102–2106.
- Nobusato A, Uchiyama I, Ohashi S & Kobayashi I (2000) Insertion with long target duplication: a mechanism for gene

- mobility suggested from comparison of two related bacterial genomes. *Gene* 259: 99–108.
- Otal I, Martin C, Vincent-Levy-Frebault V, Thierry D & Gicquel B (1991) Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29: 1252–1254.
- Pellic V, Jackson M, Reyrat JM, Jacobs Jr WR, Gicquel B & Guilhot C (1997) Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *P Natl Acad Sci USA* 94: 10955–10960.
- Pestel-Caron M & Arbeit RD (1998) Characterization of IS1245 for strain typing of *Mycobacterium avium*. *J Clin Microbiol* 36: 1859–1863.
- Plikaytis BB, Crawford JT & Shinnick TM (1998) IS1549 from *Mycobacterium smegmatis* forms long direct repeats upon insertion. *J Bacteriol* 180: 1037–1043.
- Rezsöhazy R, Hallet B, Delcour J & Mahillon J (1993) The IS4 family of insertion sequences: evidence for a conserved transposase motif. *Mol Microbiol* 9: 1283–1295.
- Ritacco V, Kremer K, van der Laan T, Pijnenburg JEM, de Haas PEW & van Soolingen D (1998) Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates. *Int J Tuberc Lung D* 2: 242–251.
- Safi H, Barnes PF, Lakey DL, Shams H, Samten B, Vankayalapati R & Howard ST (2004) IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 52: 999–1012.
- Small PM & van Embden JDA (1994) Molecular epidemiology of tuberculosis. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control* (Bloom BR, ed), pp. 569–582. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Soto CY, Menéndez MC, Pérez E, Samper S, Gómez AB, García MJ & Martín C (2004) IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *J Clin Microbiol* 42: 212–219.
- Szeverényi I, Hodel A, Arber W & Olsz F (1996) Vector for IS element entrapment and functional characterization based on turning on expression of distal promoterless genes. *Gene* 174: 103–110.
- van Soolingen D, Bauer J, Ritacco V *et al.* (1998) IS1245 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium avium* isolates: proposal for standardization. *J Clin Microbiol* 36: 3051–3054.
- Vilei EM, Nicolet J & Frey J (1999) IS1634, a novel insertion element creating long, variable-length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type. *J Bacteriol* 181: 1319–1323.
- Wayne LG & Kubica GP (1986) Genus *Mycobacterium* Lehmann and Neumann. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (Krieg NR & Holt JG, eds), pp. 1436–1457. The William & Wilkins Co., Baltimore, MD.

〈原 著〉

NICUにおけるカテーテル挿入時のマキシマムバリアプリコーションの必要性

戸石 悟司^{1,2)}・加部 一彦¹⁾

Necessity of Maximum Barrier Precautions for Catheterizations in Neonatal Intensive Care Units

Satoshi TOISHI^{1,2)} and Kazuhiko KABE¹⁾

¹⁾Department of Neonatology, Aikou Hospital

²⁾Presently Department of Neonatology, Asahi General Hospital

(2008年6月3日 受付・2009年3月10日 受理)

要 旨

中心静脈カテーテル関連血流感染症(CR-BSI)は、院内感染症の中でも重要な感染症であり、その対策としてマキシマムバリアプリコーション(MBP)の徹底がCDCより推奨されている。一方、本邦の新生児集中治療室(NICU)においてはこのような対策を行っていない施設が多いにも関わらず、米国の新生児医療施設に比べ院内感染発生率が低い事が知られている。今回、MBPを行っていない当院NICU過去5年間におけるCR-BSIの発生率を調査することで、我が国におけるカテーテル挿入時のマキシマムバリアプリコーションの必要性について考察した。

2002年から06年までの5年間の経皮的中心静脈カテーテル(PICC)挿入は年間平均55症例、70回。同期間における、のべカテーテル挿入日数は3652日/5年であった。CR-BSIの定義は、国立大学医学部附属病院感染対策協議会によるフローチャートを改変し解析を行った。全米病院感染サーベイランス(NNIS)のデータ1000g未満の児のCR-BSIが1000 catheter-daysあたり10.6と高値であるのに対し、当院のデータは疑い例を含めても0.81と非常に少なかった。PICC挿入時には、原則として滅菌手袋の着用は行われず、アルコールによる手指消毒のみの操作で、臨床的にCR-BSIが問題となる事はなかった。

出生直後の新生児には皮膚常在菌叢が定着しておらず、無菌状態に等しい事や新生児は免疫学的にも未成熟である事を念頭に、NICUにおいては感染予防対策としてきめ細やかな管理を行っていることに加えて、児に対するほとんどの処置が閉鎖環境である保育器(クベース)内を中心に行われることがこの結果に関係していると考えられた。我が国よりも院内感染症発生率の高い欧米の基準に基づく感染対策を導入するに際しては、我が国の現状を十分に考察した上で、その必要性に関してはさらにエビデンスの蓄積が必要であると思われる。

Key words : NICU (新生児集中治療室), カテーテル関連血流感染症, マキシマムバリアプリコーション

はじめに

経皮的中心静脈カテーテル(PICC)は新生児集中治療室(NICU)において必須の手法で、末梢静脈カテーテルに比してラインの再確保にともなう児への侵襲を減らし、ラインの長期維持が可能である事、繰り返し多種の抗菌薬を中心静脈内にすみやかに投与する事が可能等の

メリットがある。その反面、院内感染症の中でも重要な合併症のひとつである中心静脈カテーテル関連血流感染症(CR-BSI)の発症が大きな問題となり、その対策としてマキシマムバリアプリコーション(MBP)の徹底が米国疾病管理予防センター(CDC)より推奨されている。CDC推奨のMBPでは、感染リスクの大きい中心静脈カテーテルの場合、帽子、マスク、長袖の滅菌ガウン、滅菌手袋、大きな清潔覆布を用いることで、標準的バリア

¹⁾愛育病院新生児科, ²⁾現 旭中央病院新生児科

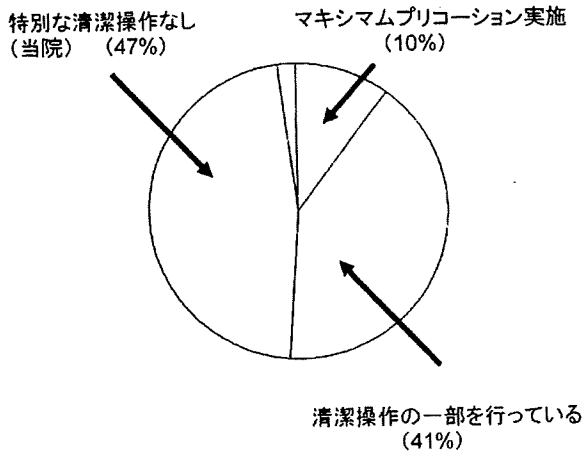
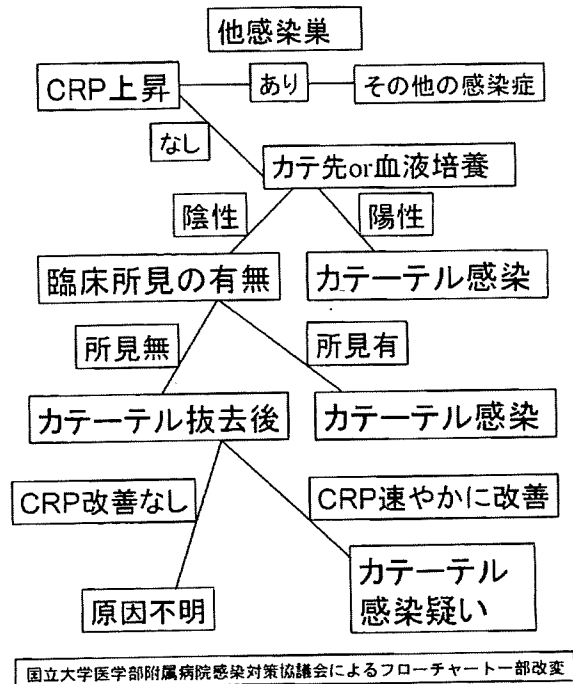


図1 本邦NICU全国アンケートにおけるマキシマムプリコーション遵守率
大木康史, ほか. 新生児経皮的中心静脈カテーテルの管理と合併症に関するアンケート調査 日周産期・新生児会誌 2006; 42(1): 17-24. データの一部を円グラフ化

アプリコーション(滅菌手袋と小さな覆布)よりCR-BSI発生を減らすことができると成人領域において、ライン挿入時の皮膚常在菌による汚染がカテーテルの保菌やCR-BSIの原因となりうることを示したRaadらのデータを元に推奨している。一方、我が国の新生児集中治療室(NICU)を対象とした2003年の全国アンケート調査²⁾によると本邦のNICUにおいては約90%の施設でMPBは行われておらず、約40%の施設で標準的のバリアプリレコーション(滅菌手袋と小さな覆布)の実施に留まっているのが現状であった(図1)。今回、我々はカテーテル挿入に際して滅菌手袋の着用なく、アルコールによる皮膚消毒のみの操作でMBPを行っていなかった当院NICU過去5年間におけるCR-BSIの発生率を調査し、NICUにおける感染防止対策のあり方、特にCDCガイドラインの遵守の必要性について考察したので報告する。

方 法

当院NICUに2002年1月から2006年12月までの5年間に入院した児におけるCR-BSIの発生状況を診療録より後方視的に検討し、PICC挿入が行われた全症例についてその抜去理由を調査した。また、当院NICUにおいてはカテーテル感染症が「疑われた」場合、全血液培養とカテーテル先端の培養を実施している。またカテーテル抜去時もカテーテル先端の培養を行なっている。培養陽性及びCRPの上昇を認めた症例においてCR-BSIの定義に基づいて判定を行なった。



国立大学医学部附属病院感染対策協議会によるフローチャート一部改変

図2 CR-BSI診断ツリー

表1 入院患者背景

年 度	2002	2003	2004	2005	2006	平均
総入院数	333	307	308	292	263	301
超低出生体重児	18	12	22	20	14	17.2
極低出生体重児	24	29	33	26	26	27.6
PICC 挿入回数	84	65	57	79	76	72.2

背 景

対象期間中、当院NICUの年間入院総数は平均301名。その内訳は、超低出生体重児(<1000g)17.2名、極低出生体重児(<1500g)27.6名であった(表1)。NCVカテーテルによるPICC挿入は年間平均55症例、72.2回、のベカテーテル挿入日数は3652日/5年であった。PICC挿入対象となった症例は、極低出生体重児、中でも在胎32週未満の早産児や、小児外科疾患患児であった。

定 義

CR-BSIの定義は、国立大学医学部附属病院感染対策協議会によるフローチャート³⁾を改変し解析を行った(図2)。全米病院感染サーベイランス(NNIS)による12ヶ月以下の患者に対する菌血症(blood stream infection)の定義は、発熱・低体温・無呼吸・徐脈の臨床症

状の有無が一点，二点目として血管カテーテルが挿入されている患者から皮膚の汚染菌が検出され，医師がその細菌に対して抗菌薬を使用した時とされている。しかし，NICU では保育器やラジアントヒーターを用いて児の体温を一定にコントロールしている関係上，成人領域と異なり解熱したことが臨床症状の改善とは言い難い事に加えて，新生児は重篤な感染に罹患したにも関わらず「発熱」が必ずしも認められないと言う特徴を考え，これらの判断条件をチャートの一部から削除した。また，免疫能が未発達な新生児では，重篤な感染症が疑われた場合には，確定診断を待たずに積極的に抗菌薬投与を開始しており，NNIS の二点目の条件も当てはまらないものと考えられるため，カテーテル先端部位の骨髓炎や刺入部から膿瘍を認めた場合など，明らかな臨床症状があるものはその時点でCR-BSI と診断し，CRP の上昇を認めた症例では，その後の調査で他の感染巣を認めない場合に，カテーテル先端もしくは血液培養からの明らかな菌の証明が認められた場合にのみCR-BSI と診断する事とした。また，血液培養が陰性だった場合，カテーテルを抜去後にCRP の速やかな改善が認められた場合にはCR-BSI の疑いと定義した。

結 果

PICC 挿入回数は全 361 回で，平均在胎週数 29 週 6 日 (29.9±3.7 : 23~41 週)，平均出生体重 1289 g (1289 ±550 : 294~3166 g) であった。途中抜去症例は 109 例 (全体の 30%)。内訳は，閉塞 31 例，腫脹 41 例，死亡・事故抜去などのその他 15 例，CRP 上昇が認められた症例は 22 例であった。この感染が疑われた CRP の上昇を認めた 22 例のうち，その後の調査で他病巣の判明したものは 18 例であった。血液培養から菌の検出を認め CR-BSI と診断されたのは 1 例 (全挿入回数の 0.28%) で，カテーテル抜去後に CRP の速やかな改善が認められ CR-BSI 疑いと考えられた症例は 3 例 (全挿入回数の 0.81%) であった。我々の施設のデータは，全国アンケート調査²⁾による本邦 NICU の CR-BSI 発生推定頻度の 0.33~0.48% とほぼ同じであり，また欧米の報告⁴⁻⁶⁾に見られる 1.3~5.3% よりも低い結果であった。

考 案

出生直後の新生児においては，皮膚常在菌はほとんど

存在しておらず，そのとき初めて使用する滅菌された保育器内での処置であれば周囲からの付着菌波及も考えにくいので MBP がどの程度意義があるかの結論は得られていない。当院では処置時間が長くなることで簡単に低体温に陥りやすい新生児の特徴に配慮し，速やかに処置を終わらせることを最優先としていたため，また点滴挿入自体が，特に超低出生体重児では高度の技術を要求されるため，挿入時の手袋の着用は最近まで行われてこなかったが，これまで臨症的に CR-BSI が問題となる事はなかった。さらに米国における NNIS のデータ⁷⁾に示された全年齢のなかで 1000 g 未満の児の CR-BSI が 1000 catheter-days あたり 10.6 と高値であったのに対し，当院のデータは疑い例を含めても 0.81 (表 2) と非常に低い結果であった。これは，本邦における NICU の感染管理の特殊性に関与していると考ええる。本邦の NICU では急性期，またはカテーテル留置時は頻回の CRP 測定を行っている事，CRP の上昇を認めた場合には，陰性範囲内 (<0.3 mg/dL) の上昇であっても感染症を疑い注意深い観察や，場合によっては抗菌薬投与を開始していると言った事情に加え，閉鎖環境であるクベース内における処置が当院では 95% を占めることも CR-BSI が発症しにくい要因になっているものといえる。また，挿入手技や無菌操作についても海外との比較検討が困難なため，当院の方法をここで述べる。術者は擦式の速乾性アルコール消毒により手指衛生を肘まで十分に行ううえで，また，前処置として皮膚の消毒をアルコールでしっかりと行い十分に乾かした上で処置を開始し，クベースの窓枠，他に触れないように十分に注意した上で手をクベース中に入れ操作を行う。NCV カテーテルによる PICC 挿入は，末梢静脈カテーテルと同様の手技からカテーテルを刺入部より先に進めていき固定できるため，無菌操作について特別なことは行っていない。このように当院では，清潔不清潔の区分の徹底をすること，煩雑な手技を増やさないような物品，操作の工夫を行うことが重要と考え，この基本手技の周知徹底が感染率の低さにつながっているのではないかと推測する。

ここで，CR-BSI のリスクを増大する因子について考察する。一般に，PICC 挿入期間，特に経静脈栄養に使用している期間が長期化すると CR-BSI の頻度は増加し，挿入日齢が 1 週間以降であることも CR-BSI と関連していると指摘されており，PICC の挿入期間では

表 2 出生体重別のベカテーテル挿入日数あたり CR-BSI 発生率

	施設数	データ取得期間	<1000 g	1000-1499 g	1500-2499 g	>2500 g
NNIS	141	1995-2003	10.6	6.4	4.1	3.7
当院		2002-2005	0.28(0.81) [※]	0(0.28) [※]	0	0

「※疑い例を含む」

きるだけ短期間であることが望ましく、また、生後1週以降に挿入する際には皮膚常在菌による汚染が発生しやすいことを念頭に置く必要がある。さらに、子宮内感染が疑われる症例については、出生直後の児であっても皮膚に病原細菌が存在する可能性があり、しっかりと皮膚の消毒を行うことも重要である。またCDCのガイドラインでは「急変時や救急搬送時などの無菌手技で留置されなかった場合、血流感染の可能性があるため、可能な限り48時間以内に入れ替えを行なう」とされているが、カテーテル挿入後72時間以内の感染疑いの症例が当院では一例も認めないことより挿入時のMBPの有無は感染率には影響を与えないとも考えられる。

PICCへの病原体の進入経路としては、挿入部皮膚や側注ポート・三方活栓の病原体による汚染も関係し⁹⁾、カテーテルの閉鎖系システム(一体化型システム)を用いることは、保育器内で静注を清潔に行う際、三方活栓より取り扱いが容易な事は感染予防上有利であると考えられるが、使用時、病原体をポート内に押し込まないように、ポート表面を十分に消毒すると言った配慮が必要な事に加えて、製剤の混注、輸液回路、皮膚等の常在菌管理、挿入時の手技等を含めた総合的な感染防止体制の整備が重要であることを認識する必要がある¹⁰⁾。この点に関し、CDCガイドライン等のガイドラインがカテーテル感染予防についての総合的な対策の指針として、各施設におけるNICUの現状を考慮に入れた感染対策を立てる際の参考になるものと考えられる。我が国のNICUにおいては、これまで述べてきたように常に感染予防を念頭にきめ細やかな管理が行われて来たため、仮にCR-BSIの因子があったとしても、刺入部やカテーテル先端部位の注意深い観察や日々の感染管理を行うことで早期発見ができていていると考えられる。

以上の事より当院の施設においては、以下にあげる「基本をしっかり徹底すること」が遵守されていることが感染率の低さにつながっているのではないかと考える。

- 製剤の混注、輸液回路、皮膚等の常在菌管理、挿入時の基本手技などが徹底されていること
- 早期に栄養を確立し状態を安定させることにより、のべカテーテル挿入日数の短縮を図ること
- 刺入部やカテーテル先端の状態の確認や、バイタルサインや検査データの変化に着目し注意深い経過観察を行うこと
- ICTラウンドやカンファレンスを活用し、日頃から感染防止に対しての意識向上に努めること

NICUへのMBPの導入に関し、我が国よりも院内感染症発生率の高い米国CDCの基準に基づく感染対策を導入するに際しては、今後さらに我が国の新生児医療の現状や各NICUでの感染症の院内感染やCR-BSIの発生状況などのエビデンスの蓄積が必要であり、単に「CDCが推奨するから」と言った根拠でやみくもにMBPを導入する事は必ずしも院内感染の発生を防止することにつながらないばかりか、場合によっては感染対策のdowngradeになりかねない可能性がある事に留意すべきである。

文 献

- 1) Raad II, Hohn DC, Gilbreath BJ, Suleiman N, Hill LA, Bruso PA, *et al.*: Prevention of central venous catheter-related infections by using maximal sterile barrier precautions during insertion. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994; 15: 231-8.
- 2) 大木康史, 吉澤幸弘, 渡邊正之, 森川昭廣: 新生児経皮的中心静脈カテーテルの管理と合併症に関するアンケート調査. *日周産期・新生児会誌* 2006; 42(1): 17-24.
- 3) 国立大学医学部附属病院感染対策協議会編集: 病院感染対策ガイドライン. 朝日新聞, 東京, 2004. p. 138.
- 4) Neubauer AP: Percutaneous central i.v. access in the neonate: experience with 535 silastic catheters. *Acta Paediatr* 1995; 84(7): 756-60.
- 5) Chathas MK, Paton JB, Fisher DE: Percutaneous central venous catheterization. Three years' experience in a neonatal intensive care unit. *Am J Dis Child* 1990; 144(11): 1246-50.
- 6) Cartwright DW: Central venous lines in neonates: a study of 2186 catheters. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89: F504-8.
- 7) NNIS System: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2003. issued August 2003. *Am J Infect Control* 2003; 31: 481-98.
- 8) Mahieu LM, De Muynck AO, Ieven MM, De Dooy JJ, Goossens HJ, Van Reempts PJ: Risk factors for central vascular catheter-associated bloodstream infections among patients in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2001; 48: 108-16.
- 9) Edwards WH: Preventing nosocomial bloodstream infection in very low birth weight infants. *Semin Neonatol* 2002; 7: 325-33.
- 10) 小林寛伊, 他: エビデンスに基づいた感染防御第3集一展開編. メジカルフレンド社, 東京, 2003. p. 42-58.

[連絡先: 〒289-2511 千葉県旭市イ1326

旭中央病院新生児科 戸石悟司

E-mail: gzw06457@nifty.com]

病原体の進化による疾病

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

山根一和* 荒川宜親

要 旨

- ・黄色ブドウ球菌は抗菌薬の開発とともに次々と新たな薬剤耐性機序を獲得して多剤耐性化することで、院内感染症の主要な原因菌として大きな問題となっている。
- ・メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、現在、日本の臨床現場において分離される黄色ブドウ球菌の約 60%を占めている。
- ・2002 年には MRSA 感染症の治療薬の一つであるグリコペプチド系抗菌薬に高度耐性を示すバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)が米国において分離された。
- ・従来、院内感染の原因として考えられてきた MRSA であるが、米国を中心に近年、市中感染型 MRSA(USA300)が急速に蔓延している。
- ・MRSA 感染症に対して有効な抗菌薬は限られており、国内で未承認の抗菌薬はいくつか存在するものの、今後新しい抗菌薬が開発される可能性は低い。

はじめに

人類はこれまでにさまざまな抗菌薬を発見、開発し感染症の治療に用いてきた。図 1 に現在に至るまでの抗菌薬の臨床利用が始まった年を年代別にまとめた。この図から、多くの抗菌薬は 1960～1970 年代までに発見されていることがわかる。しかし一方で、科学がめざましく進歩したにもかかわらず、人類が人工合成した抗菌薬(抗菌化学療法剤)は非常に少なく、サルファ剤、キノロン、オキサゾリジノン、その他、抗結核薬であるパラアミノサリチル酸(PAS)やイソニアジド、ピラジナミドなどほんの少数であり、現在臨床現場で利用されている抗菌薬のほとんどの種類は放線菌などの微生物が産生する天然の抗菌物質そのもの、あるいはそれらに若干の化学修飾を加えられたもの

(抗生物質)が大半である。

このような天然の物質を産生する微生物は、自己の産生する抗菌物質から自己を守るための仕組み(耐性遺伝子)を持っていることが多い。また、環境中の細菌は、周囲の微生物が産生する抗菌物質から身を守るための自己防衛手段として耐性遺伝子を生来保有していることがある。これらの環境中の非病原性の微生物が保持する自己防衛遺伝子(耐性遺伝子)が何らかの契機でヒトの病気の原因となる細菌に獲得されることが、病原細菌の薬剤耐性化の一因である。

新しい抗菌薬の発売は 1980 年代にピークを迎えており、その当時は新しい薬剤耐性菌が出現しても新しい抗菌薬を開発することによって対応することができた。しかし、医療の高度化が進み、易感染患者が増加する一方で新しい抗菌薬の開発はほとんど進んでおらず、薬剤耐性菌による感染

*YAMANE Kunikazu, ARAKAWA Yoshichika 国立感染症研究所細菌第二部〔〒208-0011 武蔵村山市学園 4-7-1〕

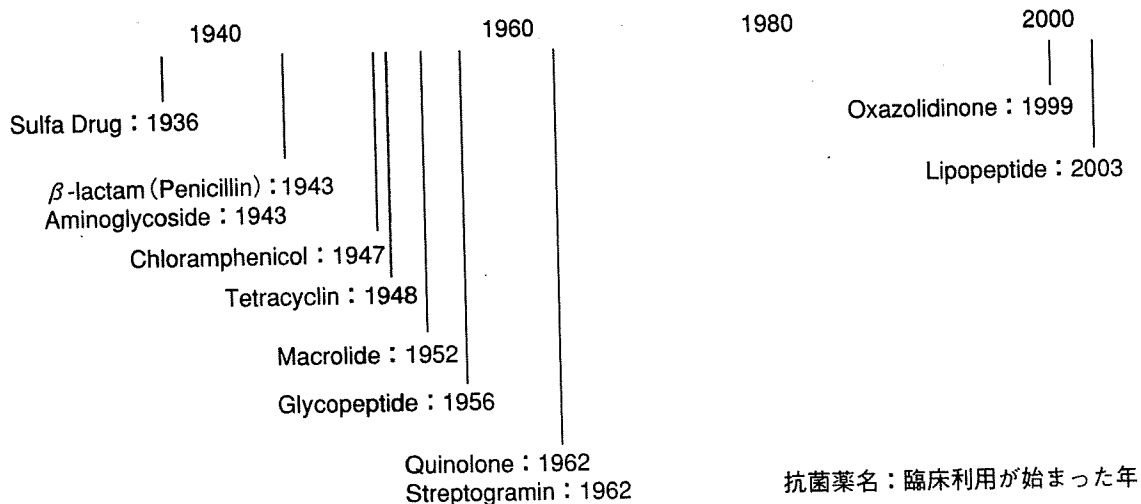


図1 抗菌薬開発の歴史

1940～1960年代にかけて多くの種類の抗菌薬が発見されたが、その後2000年までの約40年間、新しい種類の抗菌薬が市場に出ることはなかった。オキサゾリジノン（リネゾリド）は1999年に市場に出ているが、元となる物質は1970年代に合成されている。多くの抗菌薬は微生物が産生する抗菌物質に由来し、人類が完全に人工合成した抗菌薬はサルファ剤、キノロン、オキサゾリジノンなど少数にすぎない。

症の治療は徐々に困難なものになっている。

本稿では、黄色ブドウ球菌の耐性化を例に、病原細菌の進化（薬剤耐性化）について述べてみたい。

なお、本稿では「院内感染」または「院内感染症」という言葉を用いているが、医療機関内で治療を受ける際に、入院患者などに、何らかの病原体が感染し、本来の疾患とは直接関連のない感染症を二次的に発症した場合、それらは院内感染症、病院感染症、医療関連感染症など、さまざまな用語で表現されており、特に断らない限り、「院内感染症」および「院内感染」と表記を統一する。「院内感染」とは、上述したように、医療機関内で患者などに何らかの病原体が感染することを意味するが、必ずしも感染症の発症を意味するものではなく、無症状の保菌状態（定着）や不顕性感染の状態も含む。

黄色ブドウ球菌の細菌学的特徴

黄色ブドウ球菌は、ブドウ球菌属の一菌種であり、細菌検査で一般的に行われるグラム染色で濃青～紺色の球状に染まるため、グラム陽性球菌と呼ばれるグループに属する。近縁の菌種として、

表皮ブドウ球菌などがある。また、腸球菌や肺炎球菌、化膿性レンサ球菌なども、同じグラム陽性球菌のグループに属する。一方、バチルス・セレウスなどのバチルス属菌や破傷風菌などのクロストリジウム属菌も、グラム染色で陽性に染まるが、球状ではなく細長い形態（桿状）をしているため、グラム陽性桿菌のグループに属し、黄色ブドウ球菌とは遺伝的にもやや遠い関係にある。

黄色ブドウ球菌は、各種の腸管毒素（エンテロトキシン enterotoxins；SET-A～E）、プロテインAやコアグラーゼなど抗体の活性抑制や貪食細胞の遊走を阻害する蛋白や酵素、スタフィロキナーゼなど各種の蛋白分解酵素、DNA分解酵素、脂質分解酵素、 α 溶血毒素などの組織・細胞破壊酵素群などを生来産生するため病原性が強い部類の細菌に属し、多様な感染症を引き起こす。さらに、一部の株では、バクテリオファージなどに依存して、パントン・バレンタイン・ロイコシジン（Panton-Valentine leucocidin；PVL）、トキシックショックシンドロームトキシン-1（toxic shock syndrome toxin-1；TSST-1）やエキソフォリアチン（exfoliative toxin A, B；ET-A, ET-B）などの毒素を産生する。

黄色ブドウ球菌による感染症

黄色ブドウ球菌は、前述したようにさまざまな毒素や組織破壊性酵素などを産生し、ブドウ球菌属の中ではもっとも病原性が強いとされているが、健常者でも皮膚や鼻前庭などからしばしば分離される。しかし、健常者では、感染症を引き起こさず鼻前庭や皮膚、消化管に定着しているのみのことも多く、その場合、無症状のため問題視されることもなく、検査は行われず、看過されるのが一般的である。そのため、各種の抗菌薬耐性を獲得している以外には黄色ブドウ球菌と生物学的に同等な、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) の無症状保菌者の発見が遅れ、院内感染の感染源となった例も報告されている¹⁾。

黄色ブドウ球菌(MRSAを含む)は皮膚感染症から菌血症などの重症感染症、さらに食中毒といった多彩な感染症を引き起こすことが知られているが、病態としては、①皮膚・軟部組織の化膿性病変、②菌血症およびそれに付随する全身臓器の播種性病変、および③黄色ブドウ球菌の産生する毒素による疾患に大別すると理解しやすい²⁾。

①では癰(carbuncle)、癬(furuncle)、蜂窩織炎などが代表的な疾患であるが、これが深部組織に波及することによって骨髓炎や術後の深部臓器感染症となる。②の例としては、菌血症を引き起こした黄色ブドウ球菌が心臓の弁に感染する心内膜炎後にさまざまな組織や臓器に膿瘍が形成される病態などがあげられよう。③では局所感染を起こした黄色ブドウ球菌が産生する毒素(TSST-1)による全身性の toxic shock syndrome や ET-A, B(最近では epidermolytic toxin と呼ばれる)による伝染性膿痂疹(とびひ)や乳幼児の皮膚剥離(SSSS)を起こすなどが良く知られているが、多くの黄色ブドウ球菌が生来産生している多様な腸管毒素(enterotoxins)による疾患としては、黄色ブドウ球菌性食中毒がその代表である。

MRSAは院内感染の主要な原因菌であり、血管内留置カテーテルなどの医療デバイスに関連した感染症(カテーテル関連血流感染、人工呼吸器関連

肺炎、尿路カテーテル挿入による尿路感染など)や手術部位感染症の原因となることが多い。このような入院患者への感染経路は、主に医療従事者の手指を介することがほとんどであることから、手指衛生(手洗いと消毒など)や保菌患者の個別管理などの接触感染予防策の徹底が重要である。しかし、MRSAの母体である黄色ブドウ球菌は、食品中や動物の皮膚や腸管内などの体表面、動物組織内など栄養豊富な環境で成育、増殖することに適応した病原菌であり、緑膿菌のようにヒトの患部から離脱し、水回りなど栄養が乏しい湿潤環境で持続的または旺盛に増殖することはなく、その点が緑膿菌との感染対策上の相違点の一つになっている。

黄色ブドウ球菌の抗菌薬耐性獲得の歴史

1929年にフレミングにより発見されたペニシリンは、1943年に工業的な大量生産が開始され、多くの人々を感染症から救ったが、そのわずか3年後の1946年にはペニシリン耐性ブドウ球菌が出現した。このペニシリン耐性ブドウ球菌は、ペニシリナーゼと呼ばれるペニシリンのβ-ラクタム環を加水分解する酵素(β-ラクタマーゼ)を産生することによってペニシリン耐性を獲得した。このようなペニシリナーゼ産生黄色ブドウ球菌に対して、ペニシリナーゼに分解されにくいペニシリンであるメチシリンが1960年に開発された。しかしながら、メチシリンが市場に出たすぐ、耐性菌の報告がなされている。

その後、アンピシリンなどに代表される合成ペニシリンやペニシリン系以外のβ-ラクタムであるセファロsporin系抗菌薬の開発が急速に進んだ。セファロsporin系は、グラム陽性菌を主にターゲットとした第一世代からグラム陰性菌もカバーできる第三世代が開発されるに及び、1980年代には臨床現場で大量の第三世代セファロsporinが使用されるようになった。これとほとんど時を同じくして、世界各地でMRSAの医療機関における蔓延が急速に進行し深刻な問題となり、現在では日本の臨床現場で分離される黄色ブドウ球菌のうちMRSAの占める割合は約60%に及んで

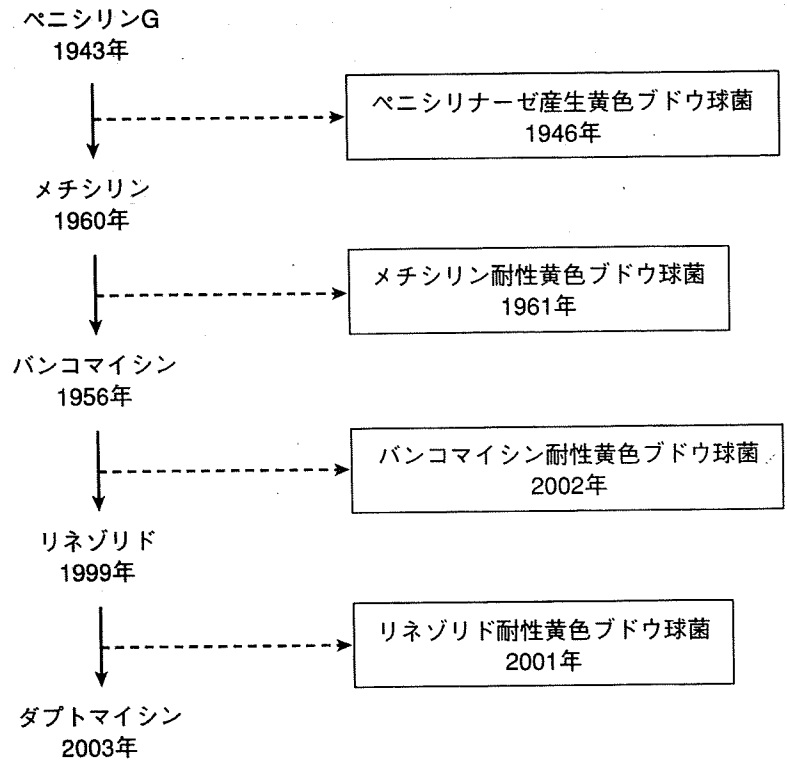


図2 抗菌薬の開発と黄色ブドウ球菌の薬剤耐性獲得の歴史
 新しい抗菌薬が開発されると、それに対して黄色ブドウ球菌は着実に耐性機構を獲得してきた。日本では2006年にMRSAに対してリネゾリドが保険適用となったが、リネゾリド耐性黄色ブドウ球菌の報告も散見されつつある。

いる。

さらに、日本ではいまだ確認されていないが、2002年にはバンコマイシン耐性遺伝子(*vanA*)を保有した黄色ブドウ球菌(*vancomycin-resistant S. aureus*; VRSA)が米国で分離され、その後、米国では少なくとも7症例からこの種のVRSAが検出されているが、幸いなことに患者間で伝播拡散した事例は確認されていない。一方、米国のみならず2008年にはインドでもVRSAの分離が報告されており、VRSAの今後の発生動向を監視する必要がある。

MRSAやVRSAを含むグラム陽性菌に有効であるリネゾリドに対しても、すでに耐性を獲得した黄色ブドウ球菌が米国では蔓延している³⁾(図2)。VRSAが臨床検体から分離される頻度は少なく、現時点ではリネゾリド耐性VRSAの発生は確認されていないが、将来VRSAが蔓延するようなことがあれば、リネゾリド耐性VRSAの出現も十

分子想されるため楽観は許されない。

MRSAの耐性機序

MRSAはその名称の中に“メチシリン耐性”とあるが、実際に臨床現場で分離されるMRSAはペニシリン系のみならず、すべてのβ-ラクタム系抗菌薬に対して耐性を示す。このβ-ラクタム薬耐性機序は、初期のペニシリン耐性黄色ブドウ球菌が保持していた耐性機序であるβ-ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)の産生とは異なり、ペニシリンの標的分子であるペニシリン結合タンパク(*penicillin binding protein*; PBP)の変化であり、具体的には黄色ブドウ球菌がβ-ラクタム薬の親和性の低下した新たなPBPを獲得することによる。このβ-ラクタム薬の親和性が低下したPBPはPBP2'と呼ばれており、PBP2'をコードする遺伝子が*mecA*である。

mecA は黄色ブドウ球菌の染色体上に存在する遺伝子構造である *Staphylococcal cassette chromosome* (SCC) に組み込まれていて、この構造全体は *SCCmec* と呼ばれている。*SCCmec* は 30~80kbp にも及ぶ巨大なトランスポゾン様の構造を持つ DNA 領域で、黄色ブドウ球菌の染色体上に存在するが、 β -ラクタムに感性を示す黄色ブドウ球菌には存在しないこと、*SCCmec* 上にコードされている cassette chromosome recombinase (*ccr*) の発現によって染色体上から切り出されることから染色体上を“動く”外来性の DNA 領域であることが指摘されている⁴⁾。

現在、*mecA* の周辺構造の違いから *SCCmec* は Type I ~ V の 5 種類に分類されており、医療環境で分離される MRSA (hospital-acquired MRSA ; HA-MRSA) の *SCCmec* は type I, II, III であることが多く、特に日本の医療環境で分離される HA-MRSA はほとんどが type II である^{5,6)}。MRSA は β -ラクタム薬のみならず、さまざまな抗菌薬に耐性を示すがその一因として *SCCmec* 上にはさまざまな薬剤耐性遺伝子が集積していることがあげられる。一方、市中獲得型 MRSA (community-acquired MRSA ; CA-MRSA) は、type IV の *SCCmec* を保有することが多いが、これは type II の *SCCmec* より短く、担う薬剤耐性遺伝子の数も少ないため、後述するように CA-MRSA にはまだ有効性が期待できる抗菌薬がいくつか残されている。

VRSA の耐性機序

バンコマイシンやテイコプラニンなどのグリコペプチド系抗菌薬は、細菌の細胞壁の合成を阻害することによって抗菌力を発揮する。具体的には細胞壁の構成成分であるペプチドグリカンの前駆体である pentapeptide の C 末端である D-Ala-D-Ala (D-アラニル-D-アラニル) 構造にグリコペプチド系抗菌薬が結合することにより、ペプチドグリカン鎖間をつなぐペプチド結合の架橋形成が阻止され、強固な細胞壁の構築が阻害される。

腸球菌ではバンコマイシン耐性遺伝子である *vanA*, *vanB*, *vanC* がコードするタンパク (VanA,

VanB, VanC など ; リガーゼ : 現在ではその他 4 種類が知られている) は、通常では pentapeptide の C 末端が D-Ala-D-Ala となることを、D-Ala-D-Lac (VanA, VanB) や D-Ala-D-Ser (VanC) へと変化させることにより、グリコペプチド系抗菌薬の pentapeptide 末端への結合を妨害し、その結果、*vanA* などの耐性遺伝子保有株はグリコペプチド系抗菌薬耐性を獲得する。

バンコマイシン耐性のグラム陽性菌で、人に病原性を示すものとしては、バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin-resistant *Enterococci* ; VRE) がもっとも有名であるが、日本ではいまだ分離頻度はそれほど多くはない。しかし、欧米を中心に一部のアジア諸国 (韓国など) では医療機関での蔓延が問題となっている。腸球菌と黄色ブドウ球菌では、臨床的な重要度は黄色ブドウ球菌の方がはるかに高く、腸球菌の保有するバンコマイシン耐性遺伝子が実験的に黄色ブドウ球菌に導入しうることから、VRE が蔓延している状態のもとで VRSA が医療環境から分離される危険性が指摘されていた。

VRSA は 2002 年、米国ミシガン州の糖尿病を基礎疾患に持つ 40 歳の女性から初めて分離され、VRSA が分離された患者は糖尿病による足部の潰瘍などの治療のためにバンコマイシンの投与を長期間受けており、VRSA 分離の際に、同時に VRE も同じ検体から分離されている⁷⁾。分離された VRSA のバンコマイシン耐性には *vanA* が関与しており、同じ検体から分離された VRE が保持するプラスミドにコードされていた *vanA* を含むユニット (Tn1546) が MRSA の保持するプラスミド上に転移することにより、バンコマイシン耐性を獲得したと考えられている⁸⁾。

VRSA の第 1 例目から 2006 年に分離された第 7 例目までの報告⁹⁾によると、7 例中 6 例でバンコマイシンの使用が VRSA 分離以前 3 カ月以内になされており、4 例では VRE を保持していたことが明らかになっている。これらの結果から、VRSA の出現する前提として、バンコマイシン耐性遺伝子の供給源である VRE が蔓延していること、バンコマイシンが長期間使用されていることがあると思われる。

表 米国で蔓延している市中感染型 MRSA と院内感染型 MRSA の比較

	市中感染型 MRSA	院内感染型 MRSA
薬剤感受性	オキサシリンに耐性を示す その他の抗菌薬には感性を示すことが多い	β-ラクタム以外の抗菌薬にも耐性を示す
SCCmec type	IV型 V型	I型 II型 III型 (日本ではII型が多い)
PVL*遺伝子保有頻度	高い	低い
感染患者	健康な小児, 成人	入院患者, 特に高齢者
臨床的特徴	皮膚・軟部組織感染症が多いが, 重症感染症 も報告されている	臨床像は多彩
日本における分離頻度	まれ USA300 株は輸入例のみ	臨床分離される黄色ブドウ球菌の約 60%

*PVL: Panton-Valentine leukocidin

日本ではバンコマイシンは MRSA 感染症用の抗菌薬として限定的に使用されており, 臨床現場で米国ほど多用されていないこと, また VRE が臨床検体から分離されることもまれであることから, 現時点では VRSA が日本の臨床現場で分離される可能性はかなり低いと考えられる。しかし, 2000 年に入り国内でも VRE による大規模な院内感染の報告が散見されるようになり, 近年では大学病院や急性期患者を受け入れる病院における院内感染が発生している。周囲の医療機関でも入院患者のスクリーニング検査を行ったところ, 保菌患者が存在することが明らかになっており, VRE は日本の医療機関において今後保菌患者が増加する危険性が高くなってきているため, 蔓延を防止する必要があると考えられる。このことが結果的には VRSA の発生を防止することにもつながる。

VRSA はバンコマイシン耐性遺伝子(*vanA*)を保有することによりグリコペプチド系抗菌薬に耐性を示すことは上述したが, グリコペプチド系抗菌薬に低感受性を示す黄色ブドウ球菌(*vancomycin-intermediate S. aureus*; VISA)の存在も報告されている。1997 年に初めてその報告がなされたが¹⁰⁾, グリコペプチド系抗菌薬に低感受性となる原因として米国内で確認された VRSA の *vanA* の如き特定の耐性遺伝子は確認されていない。

グリコペプチド系抗菌薬は細胞壁の構築過程で, 関連する遺伝子の発現の変調など何らかの原因によりグリコペプチド系抗菌薬の標的部位であ

る pentapeptide の C 末端に露出された D-Ala-D-Ala が増加すると, それらにグリコペプチドがトラップされてしまい, グリコペプチドの菌に対する最小発育阻止濃度(MIC)が上昇すると考えられており¹¹⁾, 米国で出現した *vanA* を獲得した VRSA の耐性機序とは大きく異なることがわかっている。また国内では, バンコマイシンの MIC 値が 2~4 μg/ml となる臨床分離株が増加傾向にあると指摘されているが, それらの感染が患者の臨床予後にどのような影響を及ぼすか否かについては, いまだ論議の分かれるところである。

市中感染型 MRSA

CA-MRSA とは, 一般的に ① 入院後 48 時間以内に分離され, ② MRSA が検出された 1 年以内に入院歴がなく, ③ MRSA 検出時に医療機器の体内留置を認めず, ④ これまでの検査で MRSA の検出されることがないという条件を満たす患者から分離された MRSA である¹²⁾。このような条件を満たす株を保持する患者は, 医療従事者や患者の家族であることが多かったため, 当初は HA-MRSA が市中に広がったものと考えられていた。しかし, 1990 年代の後半から急速に米国を中心に CA-MRSA の分離頻度が高まり, 薬剤感受性パターンが HA-MRSA と異なること, パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)によるタイピングで USA300(一部 USA400)という特定の型に分類される株が蔓延していることが明らかになっている(表)¹³⁾。

さらに、近年では病院外のみならず、院内感染の原因として米国の医療機関でその分離割合が増加している¹⁴⁾。また USA300 は米国のみならずヨーロッパ、オセアニア、南米などでも分離されており、すでに世界的な流行株となりつつある。日本においてはこのタイプの株による感染症の報告例はほとんどないものの今後の動向に注意が必要である。

現在医療機関内で蔓延している HA-MRSA が、過去に病院またはクリニックなどへの入院や通院歴がある患者や、カテーテルなどの人工物を留置している患者、以前 MRSA が分離されたことのある患者などから分離されるのに対して、CA-MRSA は既往歴のない健常人から分離されることが多い¹⁵⁾。HA-MRSA がβ-ラクタム剤のみならず、さまざまな抗菌薬に対して耐性を示すのに対して、CA-MRSA は MRSA の判定に用いるオキサシリンに耐性を示すが、その他の抗菌薬(エリスロマイシンやクリンダマイシンなど)には多くの株は感性を示すことが知られている。また、PVL と呼ばれる好中球の貪食、殺菌能を阻害する毒素をコードする遺伝子を保有することが多く、SCCmec は type IV であることが多いという特徴を持つ。

HA-MRSA がさまざまな種類の感染症を引き起こすのに対して、CA-MRSA による感染症の特徴としては市中の皮膚・軟部組織感染症の原因菌として報告されることが多い¹⁵⁾。しかし一方で、壊死性肺炎に代表される重症感染症による死亡例の報告もある¹⁶⁾。日本においても米国生まれの生後3カ月の女児が USA300 クローンによる皮下膿瘍を発症した例が報告されているが¹⁷⁾、現時点では日本国内においては米国で蔓延しているタイプの CA-MRSA は確認されていない。CA-MRSA は米国では、フットボールチームやレスリングなどの格闘技の選手のような体を接触させるスポーツ選手間での伝播も確認されており、これらの経緯を踏まえて、わが国でも CA-MRSA については、今後の分離状況を注意深く監視していくことが必要と考えられる。

黄色ブドウ球菌感染症に用いられる抗菌薬

現在臨床で分離される多くの黄色ブドウ球菌は MRSA であり、次いでペニシリナーゼ産生メチシリン感性黄色ブドウ球菌で、ペニシリナーゼ非産生黄色ブドウ球菌はわずか数%を占めるにすぎない。ペニシリナーゼ非産生黄色ブドウ球菌に対しては、現在もペニシリン G を用いて治療を行うことができる。ペニシリナーゼ産生メチシリン感性黄色ブドウ球菌に対しては、欧米ではクロキサシリンなどのペニシリナーゼ耐性ペニシリンが治療に用いられるが、日本では残念なことにペニシリナーゼ耐性ペニシリンはすべて販売中止となり、注射用の黄色ブドウ球菌用ペニシリンは市場からなくなってしまった。

これらのペニシリンは長年臨床で用いられており、アレルギーの問題はあるものの安全性や有効性に関しては十分な知見が得られている。また、不必要に抗菌スペクトラムが広がらないため、正常細菌叢を乱すことが少ないと考えられる。さらに、昨今医療費の高騰が問題となっている中、新しい抗菌薬とは異なり、薬価も低いため医療費の抑制にも貢献できる可能性がある。現状ではペニシリナーゼ産生メチシリン感性ブドウ球菌には、第一世代セファロsporin であるセファゾリンなどが第一選択肢となろう。

MRSA による感染症に対しては、現在4種類の抗菌薬(バンコマイシン、テイコプラニン、アルベカシン、リネゾリド)が認可されている。バンコマイシンについては欧米での臨床研究の結果、投与量、投与方法などについての情報が得られているが、アルベカシンについては日本以外ではほとんど用いられていないため、海外では十分な臨床的な治験が蓄積されていない。リネゾリドは2006年に MRSA 感染症に対し新たに保険適用の追加承認がなされたが、薬価が高いことや副作用の出現から長期間の投与が難しいこと、この薬剤の標的分子である 23S rRNA の変異による耐性菌が比較的容易に発生することなどから第一選択薬として使用しにくい。

日本では未承認であるが、欧米ではこれらの抗