

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

複数の医療施設から分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生
Enterobacter cloacae に関する分子疫学的検討

研究分担者 氏名 舘田 一博（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）
研究協力者 氏名 石井 良和（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）
青木弘太郎（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）

研究要旨

カルバペネム系薬耐性腸内細菌科細菌の分離頻度が諸外国で増加しており、社会的な問題として捉えられている。都内3医療施設で、イミペネム低感性あるいは感性であってもオキシイミノセファロスポリン系薬に耐性を示す、メタロ-β-ラクタマーゼ (MBLs) を産生する *Enterobacter cloacae* の分離頻度が上昇したことから、これらの菌株の関連性の解明を試みた。全71株の MBL 産生 *E. cloacae* の薬剤感受性検査、MBLs 型別および分子疫学解析を実施した。さらにインテグロン構造の解析を実施した。イミペネムおよびアミカシンに対する耐性率はそれぞれ 22.5% および 0% であった。供試した 71 株の *E. cloacae* が産生する MBLs はすべて IMP-1 型であった。供試菌株は PFGE により 7 クラスに大別された。インテグロン構造解析対象 12 株がインテグロン内に保有していた遺伝子カセットは、*bla_{IMP-1}*、*aac(6')-IIc* および *bla_{IMP-1}*、*aac(6')-Ib* であった。PFGE 解析の結果、分離施設毎に個別のクラスが存在したことから、同一菌株の院内伝播が示唆された。また、同一遺伝子カセットを有するインテグロン構造が複数施設で分離された *E. cloacae* 菌株において確認されたことから、同一起源のインテグロンあるいはプラスミドが MBLs をコードする遺伝子を伝播している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Enterobacter cloacae は院内感染の病原菌として、注目されている。近年、グラム陰性菌による感染症治療に使用されるカルバペネム系薬に耐性を示す腸内細菌科細菌が増加しており、諸外国で問題視されている。東邦大学医療センター大森病院で、イミペネム (IPM) に低感性あるいは感性であってもオキシイミノセファロスポリン系薬に耐性を示す *E. cloacae* が特定期間に分離された。同時期に、都内の2医療施設でも同様の薬剤感受性を示す菌株が分離頻度されていた。そこで、3施設が保存していた71菌株の *E. cloacae* を対象に分子疫学的手法を用いて、これらの菌株間の関連性について検討した。

B. 研究方法

都内3医療施設の検査材料から約4年間に分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ (MBLs) 産生 *E. cloacae* 全71株を供試菌株とした (表1)。薬剤感受性検査は微量液体希釈法、MBLs 産生の確認はメルカプト酢酸ナトリウム SMA ディスクとセフトジジムディスクを用いたダブルディスクシナジーテスト、MBLs のグループ型別は PCR 法により決定した。分子疫学解析は、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を実施し、大別された7つのクラスから1株ずつ、

さらに同一クラス内でも IPM もしくはセフトキサシム (CTX)、アミカシン (AMK) の MIC 値が2管以上乖離している菌株を合わせた12菌株をインテグロン構造の解析対象とした。5'側および3'側に存在する共通の塩基配列を基にインテグロン構造の全長を増幅し、その増幅産物の塩基配列を直接決定した。

表1. 供試菌株の材料別分離頻度

材料	医療施設		
	A	B	C
血液	0(0%)	0(0%)	4(36.3%)
喀痰	9(45%)	6(15%)	1(9.1%)
尿	5(25%)	7(17.5%)	3(27.3%)
便	0(0%)	18(45%)	0(0%)
咽頭・鼻腔	3(15%)	1(2.5%)	1(9.1%)
気管吸引物	0(0%)	5(12.5%)	0(0%)
その他	3(15%)	3(7.5%)	2(18.2%)
計	20	40	11

倫理面への配慮

東邦大学医学部「病原微生物の取り扱いの標準

化に関わる倫理的規範構築に関する見解」(東邦医倫発第 25-2 号) に準じて対応している。

C. 研究結果

保存された 71 菌株は、薬剤感受性検査の結果、CTX、モキサラクタム(MOX)の耐性率は 100%であったのに対し、IPM の耐性率は 22.5%であった(表 2)。アミカシンの耐性率は 0%であった。それら 71 菌株は MBLs 確認検査の結果、全ての菌株においてのその産生が確認された。保存株は PFGE で 7 つのクラスタに大別された(図 1)。そのうち 5 つのクラスタはそれぞれ同一の施設で分離された菌株であった。インテグロン構造解析の結果、対象の 12 菌株のインテグロン構造内の遺伝子カセットは、5'側から *bla*_{IMP-1}、*aac*(6')-IIc (パターン A) あるいは *bla*_{IMP-1}、*aac*(6')-Ib (パターン B) の 2 種類であった(図 2)。パターン B はクラスタ 6 のみであり、その他のクラスタの代表株は全てパターン A に属するインテグロン構造を有していた。

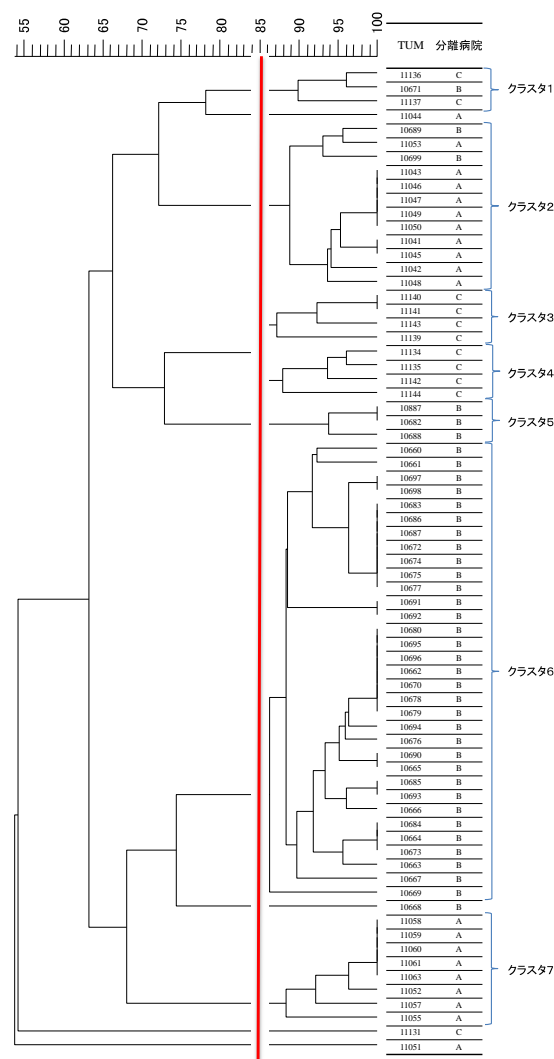
表 2. *E. cloacae* の薬剤感受性検査成績

抗菌薬	MIC レンジ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	MIC ₅₀ (μg/mL)	耐性率(%)
IPM	≤0.125-64	8	2	22.5
CTX	16-512	>512	256	100
CFPM	1-512	128	32	52.1
AZT	0.25-512	256	16	54.9
PIPC/TAZ	2/4->512/4	256/4	32/4	29.6
MOX	512->512	>512	>512	100
AMK	1-16	8	2	0
CPFX	0.25-64	2	2	46.5

IPM: イミペネム, CTX: セフトキシム, CFPM: セフェピム, AZT: アズトレオナム, PIPC/TAZ: ピペラシリン/タゾバクタム, MOX: モキサラクタム, AMK: アミカシン, CPFX: シプロフロキサシン, MIC: 最小発育阻止濃度

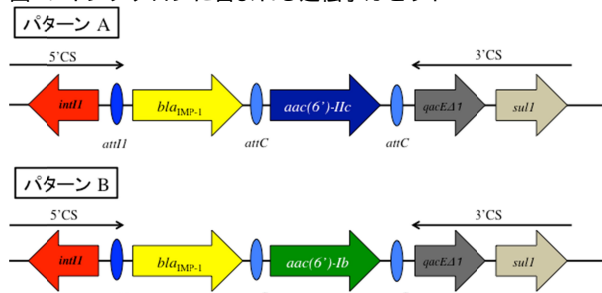
図 1. 全 71 株の PFGE デンドログラム

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]



供試菌株の PFGE バンドパターンに基づいて Fingerprinting を用いて描画したデンドログラム。解析係数は Dice、デンドログラムタイプは UPGMA を用いた。解析パラメータは optimization: 1.50%、position tolerance: 1.50% のとき、85% 以上の相同性がある菌株を同一クラスタとした。

図 2. インテグロンに含まれる遺伝子カセット



5'CS, 5' conserved segment (5'保存領域); 3'CS, 3' conserved segment (3'保存領域); *intI1*, クラス 1 インテグロンの部位特異的組換え酵素 (クラス 1 インテグラーゼ) をコードする遺伝子; *attI1*, インテグロンに関連する遺伝子カセット組換え部位; *attC* site, 59-base element と呼ばれる薬剤耐性遺伝子カセット組換え部位; *bla*_{IMP-1}, IMP-1 型 MBL をコードする遺伝子; *aac*(6')-IIc, アミノ配糖体アセチル化酵素 (aminoglycoside acetyltransferase) をコードする遺伝子。小文字のアルファベットは酵素名、ローマ数字は酵素型、カッコ内の数字は修飾部位をそれぞれ示す; *qacEΔ1*, 第四級アンモニウム塩耐性に関する遺伝子の一部; *sul1*, サルファ剤耐性に関する遺伝子

D. 考察

MBLsを含むカルバペネマーゼ産生腸内細菌科に属する菌株は、カルバペネム系薬に耐性を示すことは稀であると報告されている。本研究で対象とした MBLs 産生 *E. cloacae* 菌株は、IPM に耐性を示した菌株が 22.5%であったことから、カルバペネム系薬の薬剤感受性検査成績のみを頼りに MBLs 産生菌株を検出することは困難であることが再確認された。また、PFGE による解析の結果、特定の期間内に分離された MBLs 産生 *E. cloacae* 菌株は、分離施設毎に個別のクラスタが存在した。このことは、同一菌株が院内で伝播したことを示唆すると考えられた。すなわち、特定の MBLs 産生 *E. cloacae* 菌株が都内に拡散しているのではないことが明らかとなった。一方、本研究では複数施設の分離株から、同様の遺伝子カセットを持つインテグロン構造が確認された。この結果から、都内の医療施設で同一起源のインテグロンあるいはプラスミドが MBLs をコードする遺伝子の伝播に関与した可能性が示唆された。

E. 結論

IMP-1 型 MBLs 産生 *E. cloacae* は、オキシミノセファロsporin系薬である CTX やオキサセフェム系薬の MOX に対しては全株が耐性を示したが、カルバペネム系薬の IPM には 22.5%の菌株が耐性を示したにすぎなかった。同一施設から分離された菌株の多くは、PFGE による解析の結果、特定のクラスタに分離され、MBLs 産生 *E. cloacae* が施設内で伝播している可能性が示唆された。さらに、複数の施設から分離された菌株が有するインテグロン構造を解析したところ、同一の構造を有する菌株が存在したことから、同一起源のインテグロンあるいはプラスミドが *bla*_{IMP-1} の拡散に関与したことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 第 24 回臨床微生物学会総会. 2013 年 2 月 2 日 横浜. 『複数の医療施設から分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Enterobacter cloacae* に関する分子疫学的検討』
- 2) The 53th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Denver, USA. September 13. 2013. A molecular epidemiological study of clinical metallo-β-lactamase producing *Enterobacter cloacae* isolated in Japan』

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

