

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 メタロ β -ラクタマーゼ産生菌の検出法に関する研究

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学 / 耐性菌制御学・教授）
研究協力者 川村 久美子（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・准教授）
服部 達也（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）

研究要旨：これまで、Metallo- β -lactamase (MBL)産生グラム陰性桿菌の検出法として、double-disk synergy test (DDST)やEtestが常用されてきたが、CTX-Mタイプの基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)やCMY-型 β -ラクタマーゼなどの複数酵素を同時に産生する菌の出現と増加により、現行法のみでは対応できなくなりつつある。本研究の目的は、MBL単独産生菌のみならず複数酵素同時産生菌をも高率に検出する検出法ならびにその条件を見いだすことである。MBL産生菌24株と非MBL産生菌32株の計56株を使用した。MBL産生菌の検出法として、double-disk synergy test (DDST)、Etset MBL IP/IPI (BbioMerieux)、Cica-Beta test MBL (Kanto Chemical)、Dry-plate DPD1 test (Eiken Chemical)、Modified Hodge testの5種類を比較検討した。尚、DDSTについては、抗菌薬として ceftazidime (CAZ)、meropenem (MEPM)、imipenem (IPM)の3種類を、阻害剤として sodium mercaptoacetic acid (SMA)および EDTA を用い、disk間距離を5、10、15、20mmの4種類で比較検討した。結果、単独産生株では、抗菌薬 CAZ、阻害剤 SMA、disk間距離 5mm の DDST 法が、複数酵素産生株では、抗菌薬 MEPM、阻害剤 SMA、disk間距離 5mm の DDST 法および Dry-plate DPD1 test が最も高精度な MBL 検出法であることが明らかとなった。ただし、コスト面も考慮すると、Dry-plate DPD1 test に比し、DDST 法の方が遥かに安価で、操作法も簡便であることから、日常検査におけるスクリーニング法としては DDST 法の方が優れていると思われる。

A. 研究目的

Metallo- β -lactamase (MBL) は oxyimino cephalosporin や carbapenem を含むほとんど全ての β -lactam系抗菌薬を加水分解する酵素であり、本酵素を産生する病原細菌の増加が治療上大きな問題となっている。これまで、MBL産生グラム陰性桿菌の検出法として、微生物検査室では double-disk synergy test (DDST)やEtestが常用されてきたが、CTX-Mタイプの基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)やCMY-型 β -ラクタマーゼなどの複数酵素を同時に産生する菌が増加しつつあり、現行法のみでは正確な検出ができなくなりつつある。本研究の目的は、MBL単独産生菌のみならず複数酵素同時産生菌をも高率に検出する検出法ならびにその条件を見いだすことである。

B. 研究方法

MBL産生菌24株と非MBL産生菌32株の

計56株を使用した。MBL産生菌の検出法として、double-disk synergy test (DDST)、Etset MBL IP/IPI (BbioMerieux)、Cica-Beta test MBL (Kanto Chemical)、Dry-plate DPD1 test (Eiken Chemical)、Modified Hodge testの5種類を比較検討した。尚、DDSTについては、抗菌薬として ceftazidime (CAZ)、meropenem (MEPM)、imipenem (IPM)の3種類を、阻害剤として sodium mercaptoacetic acid (SMA)および EDTA を用い、disk間距離を5、10、15、20mmの4種類で比較検討した。

C. 研究結果

1. 単独酵素産生株/DDST法：SMA diskを用いたDDST法においては、抗菌薬CAZを用いた場合が最も感度が高く、disk間距離は5mmで感度100%、10、15mmでは感度95.2%であった。特異度はいずれの条件でもすべて100%であった。一方、EDTA diskを用いたDDST法においては、抗菌薬IPMを用いた

disk 間距離 5mm の場合が感度 81.0%、特異度 87.5%と最も良好であったが、少なからず偽陰性例および偽陽性例が認められる結果となった (Table 1)。この EDTA disk を用いた DDST 法における偽陰性例の多くは *Acinetobacter* 属菌であり (Figure 1)、偽陽性例は CMY-型 β -ラクタマーゼ産生菌であった (Figure 2)。

2. 複数酵素産生株/DDST 法: 複数酵素産生株として、NDM-1 産生株 2 株と IMP-型 MBL と CTX-M-2 型 ESBL 同時産生株 1 株を用いた。これら 3 株の複数酵素同時産生株すべてを正確に検出できた条件は、抗菌薬に MEPM を使用した disk 間距離 5mm の時のみであった。

3. 5 種類の検出法の比較: 56 株全てを対象とした場合、抗菌薬 CAZ、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の条件の DDST 法と Dry-plate DPD1 test が感度 87.5%で最も良い結果を示した。特異度は DDST 法が 100%、Dry-plate DPD1 test が 96.6%と DDST 法がやや高い値になった (Table 2)。この 2 つの検出法における複数酵素産生株の検出率は DDST 法が 3 株中 0 株、Dry-plate DPD1 test が 3 株中 2 株となり、Dry-plate DPD1 test の方が正確に検出することができた。

D. 考察

DDST 法においては、阻害剤に SMA を用いた方が感度、特異度ともに高い値が得られ、これは SMA が特異的にメタロ- β -ラクタマーゼを阻害しているためと考えられた。この SMA の特異的な阻害については、和知野らの結晶解析の結果(2013. Antimicrob Agents Chemother)がすでに裏付けている。EDTA disk を用いた DDST 法において、*Acinetobacter* 属菌で偽陰性例が多く生じた理由としては、*Acinetobacter* 属菌は EDTA それ自身に発育阻害をうけ、EDTA disk 周りに大きな阻止円が形成されたためである(Figure 1)。おそらく、*Acinetobacter* 属菌の増殖には培地中の 2 価イオンが必要であるが、EDTA がそれらをキレートしてしまうため、増殖阻害が生じたものと考えられる。CMY-型 β -ラクタマーゼ産生菌においては、EDTA disk 周りに大きな阻止円が形成され (Figure 2)、抗菌薬との間に生じる阻止円の変化を判定し難くなったことが原因と考えられる。

複数酵素同時産生株においては、単独産生株のそれとは異なり、抗菌薬は MEPM の時が

最も正確に検出できた。これは MEPM が SHV-型や CTX-M 型、CMY-型 β -ラクタマーゼによってほとんど加水分解されないためと考えられる。最終的に、単独産生株では、抗菌薬 CAZ、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の DDST 法が、複数酵素産生株では、抗菌薬 MEPM、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の DDST 法および Dry-plate DPD1 test が最も高精度な MBL 検出法であることが明らかとなった。ただし、コスト面も考慮すると、Dry-plate DPD1 test に比し、DDST 法の方が遥かに安価で、操作法も簡便であることから、日常検査におけるスクリーニング法としては DDST 法の方が優れていると思われる。

E. 結論

単独産生株では、抗菌薬 CAZ、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の DDST 法が、複数酵素産生株では、抗菌薬 MEPM、阻害剤 SMA、disk 間距離 5mm の DDST 法および Dry-plate DPD1 test が最も高精度な MBL 検出法であることが明らかとなった。ただし、コスト面も考慮すると、Dry-plate DPD1 test に比し、DDST 法の納が遥かに安価であり、日常検査におけるスクリーニング法としては DDST 法の方が優れていると思われる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hattori T., Kawamura K., and Y. Arakawa. Comparison of test methods for detecting metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacteria. Jpn. J. Infect. Dis. 2013. 66. 512-518.

2. 学会発表

1) Kawamura K., Hattori T., Arakawa Y. Evaluation of screening methods to detect metallo β -lactamase-producing Gram-negative bacteria. 第85回 日本細菌学会. 日本細菌学会誌. 2012. 67,125頁

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他