

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

分担課題 多剤耐性菌のベータラクタマーゼの解析

研究分担者 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 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

本研究では、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）の効率的な検出法について検討した。CPE 94 株の薬剤感受性検査成績において、イミペネム（IPM）、メロペネム（MEPM）およびラタモキシム（LMOX）に対してそれぞれ 9.6%、14.9%および 87.2%が耐性を示した。非感性的にカテゴライズされた菌株はそれぞれ 17.0%、31.9%および 96.8%であった。RAPIDEC CARBA NP では CPE の検出感度は 96.8%であった。シカベータテストでは、IMP 型および IMP, CTX-M 型の両酵素産生株について、判定の正確性はいずれも 95%以上であった。また、クイックチェイサー IMP は IMP 型酵素産生株において 100%の検出感度であった。本検討の結果から、LMOX に対して非感性的を示す菌株に対して、市販キットのカルバペネマーゼ産生確認試験を行うことで、効率良く CPE の検出が可能であると考えられた。

A. 研究目的

平成 26 年 9 月 19 日に感染症法が改正され、CRE 感染症が 5 類感染症として全数把握に位置づけられた。CRE の定義はメロペネム（MEPM）の最小発育阻止濃度（MIC）が 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す菌株、もしくはイミペネム（IPM）に 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ かつセフトリアゾールに 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示す菌株である。しかしながら、日本における CRE の主要なカルバペネム系薬剤耐性因子である IMP-1 グループに属するメタロ- β -ラクタマーゼ（MBL）の産生腸内細菌科細菌の多くは、MEPM および IPM に感性的（MIC 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を示すことが知られる。したがって、感染症法に定められた定義では多くの MBL 産生株を取りこぼしていることが想定される。上述のことから、IPM および MEPM はカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌（CPE）の検出には不適である。我々は、ESBL および AmpC β -ラクタマーゼに対しては安定で、MBL に対しては非常に不安

定であるという特徴をもつ LMOX を用いて、CPE の効率的な検出法を検討した。さらに、各種カルバペネマーゼ産生株について市販のカルバペネマーゼ産生確認試験キットの有用性の検討も合わせて実施した。

B. 研究方法

腸内細菌科細菌のうち、各種カルバペネマーゼ産生株 94 株、Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 産生株 3 株および AmpC β -ラクタマーゼ産生株 2 株を供試した（表）。

薬剤感受性検査は、Clinical laboratory standards institute (CLSI) の文章に準拠した微量液体希釈法にて実施し、フローズンプレート‘栄研’（栄研化学）を用いた。感性的（S）、中間耐性（I）および耐性（R）の判定は M100-S22 の文章に基づいた。測定薬剤は、IPM、MEPM および LMOX（ラタモキシム）とした。

カルバペネマーゼ産生確認試験として市販キットのRAPIDEC CARBA NP(bioMérieux), シカベータテスト(関東化学)およびクイックチェイサーIMP(ミズホメディール)を用いた。

倫理面への配慮

本研究課題の一部の供試菌株は、東邦大学医学部倫理委員会において、課題番号:25068、課題名: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、課題番号:26037、課題名:東京都立小児総合医療センターで臨床分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生グラム陰性菌のプラスミドの遺伝子解析として承認を得た。他の供試菌株は課題番号:25032、課題名:全国医療施設からの臨床分離株の薬剤耐性および遺伝型の依頼解析として非該当の判定を受けた。

C. 研究結果

カルバペネマーゼ産生株(n=94)において、IMP, MEPM および LMOX に対して耐性を示した菌株がそれぞれ 9.6%, 14.9% および 87.2% であった。同様に、非感性を示す菌株がそれぞれ 17.0%, 31.9% および 96.8% であった。MBL 産生株(n=86)において IMP, MEPM および LMOX に対して耐性を示した菌株が 4.7%, 11.6% および 94.2% であった。同様に、非感性を示す菌株が 11.6%, 30.2% および 100% であった。ESBL 産生株(n=3)のうち1株は MIC 値 IMP=4 μg/mL, MEPM=8 μg/mL および LMOX=128 μg/mL を示し、いずれの薬剤も耐性であったが、残りの2株はいずれの薬剤も感性であった。AmpC 産生株(n=2)はいずれも IMP および MEPM に感性を示した。LMOX に対しては一方の菌株は感性、もう一方の菌株は耐性を示した。

RAPIDEC CARBA NP において、GES 型カルバペネマーゼ産生株(n=3)を除いたすべてのカルバペネマーゼ産生株のカルバペネマーゼ産生性が確認された(陽性率:96.8%)。

シカベータテストにおいて、カルバペネマーゼ産生株のうち IMP 型のみ産生株(n=44)

は 95.5% が MBL 産生株にカテゴライズされた。また IMP 型および CTX-M 型の両酵素を産生する菌株は、95.2% が複数の β-ラクタマーゼ産生もしくはクラス D に属するカルバペネマーゼの産生株にカテゴライズされた。NDM 産生株(n=1)も同様に、複数の β-ラクタマーゼ産生もしくはクラス D に属するカルバペネマーゼの産生株にカテゴライズされた。また、KPC 産生株(n=3)、NMC-A 産生株(n=1)および OXA-48-like(n=1)産生株はいずれも AmpC 産生株にカテゴライズされた。GES 産生株はいずれもシカベータテスト陰性となった。

クイックチェイサーIMP において、IMP 産生株(n=85)はいずれも陽性となった(感度 100%)。その他の β-ラクタマーゼ産生株(n=14)は陰性であった。

D. 考察

薬剤感受性検査成績より、IMP および MEPM に耐性を示した CPE はそれぞれ 9.6% および 14.9% に留まった。一方、LMOX に対して耐性を示した CPE は 87.2% であり、本薬剤が IMP および MEPM に比較して CPE のスクリーニングに優れていることが示された。さらに、非感受性のカテゴリを用いると、CPE は 96.8%、MBL 産生株に限っては 100% とスクリーニング感度を向上させることが出来ると考えられた。

RAPIDEC CARBA NP は CPE における陽性率が 96.8% と非常に高感度であった。しかしながら、GES 型酵素産生株は本キットの基質である IMP に対しての耐性を示したのにもかかわらず、検出できなかった。本キットは IMP の β-ラクタム環がカルバペネマーゼによって加水分解される際に生じる分解産物による pH の低下の検出を原理とするが、GES 型酵素の一部は IMP への親和性は高い一方、分解速度が非常に遅いため、規定の判定時間内に検出出来なかったと考えられた。

シカベータテストは IMP 産生株および IMP、CTX-M 型の両酵素産生株においては、95% 以上の精度で β-ラクタマーゼの産生性について正確に判定が可能であった。NDM 型酵

素は本キットに採用されている MBL 阻害剤（メルカプト酢酸ナトリウム）に阻害されにくい性質があるため、正確な判定が出来なかった。OXA-48-like 産生株が AmpC と判定されてしまった理由は不明であった。また、GES 型酵素は本キットの基質として採用されているセファロsporin系薬の分解効率も非常に悪いため、GES 型酵素産生株はシカベータテスト陰性となったと考えられた。

クイックチェイサー IMP は IMP 型酵素産生株について検出感度が 100%であった。日本における MBL 産生株はほとんどが IMP 型であるため、本キットの使用は非常に有用であると考えられた。

E. 結論

LMOX に対して非感性を示す菌株に対して、市販キットのカルバペネマーゼ産生確認試験を行うことで、効率良く CPE の検出が可

能であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 今井和花、村上日奈子、湯本重雄、青木弘太郎、岩田守弘、榎園恭子、佐々木雅一、福澤滋、前原千佳子、安井久美子、吉住あゆみ、石井良和、舘田一博：カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の効率的な検出方法に関する検討、第26回日本臨床微生物学会総会・学術集会、2015年1月31日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. IMP-1 産生 *E. cloacae* の薬剤感受性検査成績

($\mu\text{g/mL}$)

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

菌種内訳

Enterobacter spp. : 55 株, *Escherichia coli* : 20 株, *Klebsiella pneumoniae* : 14 株, *K. oxytoca* : 10 株