

## 総説

# グラム陰性桿菌の注目すべき $\beta$ -ラクタマーゼの種類とその検出方法 — CLSI M100-S20, 2010 における推奨法を含めて —

石井 良和

東邦大学医学部微生物・感染症学講座：東京都大田区大森西 5-21-16 (〒143-8540)

Key Words  $\beta$ -ラクタマーゼ, カルバペネマーゼ, 基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ, 検出法, M100-S20

## はじめに

900 種類以上の  $\beta$ -ラクタマーゼがこれまでに報告されてきたが、1980 年代以降に発見されたものがほとんどで、使用される抗菌薬と出現した新規  $\beta$ -ラクタマーゼとの関係が議論されてきた<sup>1)</sup>。日本では、カルバペネム系薬分解型  $\beta$ -ラクタマーゼ (カルバペネマーゼ) のほぼすべてがメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) と呼ばれる酵素である<sup>2)</sup>。一方、欧米を見ると、それ以外の  $\beta$ -ラクタマーゼが多数報告されており、その中のいくつかの  $\beta$ -ラクタマーゼを産生する菌は多剤耐性を示すとされている<sup>3)</sup>。米国東海岸で発見されたカルバペネム系薬耐性肺炎桿菌は、北米全土、ヨーロッパ、中東、アジアと瞬く間に世界中に拡散した<sup>3,4)</sup>。カルバペネム系薬耐性肺炎桿菌は、現時点まで日本では輸入例と考えられる症例が 1 件報告されており、今後の動向が注目される。他にも、諸外国で問題視されているカルバペネマーゼをはじめとする  $\beta$ -ラクタマーゼは多数あることから、それらの情報とその検出方法を日本でも把握し、常に監視する必要があると思われる。本稿では、日本で未検出、あるいは検出頻度が低いカルバペネマーゼを含め、各種  $\beta$ -ラクタマーゼの酵素的特長およびその検出法について概説する。

## 基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ (extended-spectrum $\beta$ -lactamase ; ESBL) の話題

近年の分子生物学的手法の急速な発達に伴い、DNA 塩基配列などが非常に迅速かつ簡便に決定されるようになった。それに伴い、多数の TEM-型あるいは SHV-型  $\beta$ -ラクタマーゼの DNA 塩基配列が決定され、臨床材料から分離された菌株の薬剤感受性試験成績とともに、新規  $\beta$ -ラクタマーゼとして変異酵素に関する報告がされてきた<sup>1)</sup>。しかし、その中には ESBL とは違い、基質特異性が拡張されていない酵素も多数含まれていることは明らかであった。最近、Jacoby および Bush が運営するホームページには、表現系が ESBL (グループ 2be) に該当するかどうかに関する情報が提供されている (<http://www.lahey.org/Studies/>)。この中で彼らも触れているが、ESBL と呼ばれる酵素は、クラス A およびクラス D に属する  $\beta$ -ラクタマーゼである。

グループ 2be に属する  $\beta$ -ラクタマーゼの中で注目されているのが、CTX-M-型  $\beta$ -ラクタマーゼである<sup>5,6)</sup>。CTX-M-型は、CTX-M-1 グループ、CTX-M-2 グループ、CTX-M-8/25 グループおよび CTX-M-9 グループの 4 グループに大別される。その中でも、

特に CTX-M-1 グループに属する CTX-M-15 を産生する大腸菌が注目されている<sup>5, 7-13)</sup>。これまで耐性菌による感染症は病院内で、あるいは抗菌薬による治療と関連して発生すると考えられていたが、CTX-M-15 を産生する大腸菌のうち、抗原型が O25:H4 かつ Multi Locus Sequence Typing が ST131 の菌株が、イギリスやカナダにおいて市中感染の原因微生物になっているからである<sup>10, 12, 13)</sup>。Suzuki らは、ESBL 産生が疑われる 142 株の大腸菌を対象に検討したところ、ヨーロッパで拡散している CTX-M-15 産生大腸菌と同一の特徴を有する菌株は分離されなかったと報告している<sup>14)</sup>。しかし筆者らは、日本でも CTX-M-15 を産生する大腸菌で、O25-ST131 に型別される菌株を検出している。今後、日本でもこの耐性菌が拡散する可能性はあると思われる。

グループ 2d に属する ESBL は、OXA-2 のグループである OXA-15 および OXA-32、あるいは OXA-10 のグループである OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28 および OXA-35 の 2 つのグループに大別される<sup>3, 15)</sup>。日本では、これらグループ 2d に属する ESBL 産生株についての報告はない。

## MBL の種類とその疫学

グラム陰性菌が産生する主要な  $\beta$ -ラクタマーゼを表 1 に示した。この中で、グループ 2be およびグループ 3 に属する  $\beta$ -ラクタマーゼが日本では注目されている。グループ 2be に属する酵素は ESBL、グループ 3 に属する酵素はその活性に亜鉛イオンを必要とすることから MBL と呼ばれている。グループ 2be に属する酵素は、主に腸内細菌科に属する菌種が産生し、第三世代や第四世代セファロスポリン系薬のうちオキシミノセファロスポリン系薬を分解し、産生菌はこれらの抗菌薬に耐性を示す。一方、グループ 3 に属する MBL と呼ばれる酵素は、主に緑膿菌をはじめとするブドウ糖非発酵菌が産生し、多くの場合、カルバペネム系薬を含む多くの  $\beta$ -ラクタム系薬が無効になる<sup>3, 16)</sup>。

グループ 3 に属する  $\beta$ -ラクタマーゼは、さらに 3

つのサブクラスに分類される<sup>3)</sup>。サブクラスは B1 から B3 までに分類され、サブクラス B1 には IMP-型、VIM-型、SPM-型、GIM-型、SIM-型、IND-型、CcrA など、サブクラス B2 には CphA, ImiS および Sfh-1, サブクラス B3 には L1, FEZ-1, Gob-1 および CAU-1 が、それぞれ含まれている。それぞれの特徴として、サブクラス B1 および B3 に属する MBL は、アズトレオナムおよびピペラシリンを除く  $\beta$ -ラクタム系薬を分解するが、サブクラス B2 に属する MBL はセファマイシン系薬などセフェム系薬の分解を苦手としている。さらに、遺伝学的特長を比較すると、サブクラス B2 および B3 に属する MBL をコードする遺伝子は染色体上に存在し、これらは特定の菌種が産生する  $\beta$ -ラクタマーゼとして知られている。一方、サブクラス B1 に属する MBL をコードする遺伝子は、プラスミドのような外来性遺伝因子上に存在する。さらに、サブクラス B1 に属する MBL をコードする遺伝子は、インテグロンと呼ばれる特殊な遺伝子構造中に存在しており、アミノ配糖体系薬耐性遺伝子やサルファ剤耐性遺伝子、トリメトプリム耐性遺伝子などとクラスターを作り、グラム陰性菌の多剤耐性化と密接に関連している<sup>17)</sup>。図 1 にはその一例を示した。多剤耐性緑膿菌の中には、遠く離れた地域の関連性が全く認められない複数の医療施設から同一起源の菌株が分離されるものがある。この多剤耐性菌は、*aac-(6')-Iae* という特殊なアミノ配糖体系薬アセチル化酵素を保有していると報告されている<sup>18)</sup>。Kimura らは、岡山県、奈良県および埼玉県で分離された同一起源の多剤耐性緑膿菌が *aac-(6')-Iae* を保有していることを確認している<sup>17)</sup>。

世界規模で実施されるサーベイランスプログラムの一つである、MYSTIC (Meropenem Yearly Surveillance Test Information Collection) で収集された腸内細菌科に属する菌株の 98% がカルバペネム系薬に対して感性を示したのに対して、緑膿菌と *Acinetobacter baumannii* の感性率は 60% ~ 83% と低かったとの報告もされている<sup>19)</sup>。最近の MBL 産生菌に関する疫学調査によると、特定の国において、その増加が認められているようである。おそらく、MBL 産生菌の増加には、使用されている抗菌薬の種類、使用量、使用方法、

表 1. Bush-Jacoby によって提唱された  $\beta$ -ラクタマーゼの新分類 (文献 4 より改変)

	分子クラス	好適基質	阻害剤		特徴	代表的な酵素名*
			クラブラン酸またはタゾバクタム	EDTA		
1	C	セファロスポリン系薬	無効	無効	ベンジルペニシリンと比較してセファロスポリン系薬をよく分解, セファマイシン系薬も分解	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	セファロスポリン系薬	無効	無効	セフトラジウムおよび他のオキシミノセファロスポリンの分解促進	GC1, CMY-37
2a	A	ペニシリン系薬	有効	無効	ベンジルペニシリンをセファロスポリン系薬と比較してよく分解	PC1
2b	A	ペニシリン系薬, 第一世代セファロスポリン系薬	有効	無効	ベンジルペニシリン系薬とセファロスポリン系薬を同程度分解	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	第二世代, 第三世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬	有効	無効	オキシミノセファロスポリン系薬の分解促進 (セフトラキウム, セフトラジウム, セフトリアキソン, セフェピムアズトレオナム)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-15, CTX-M-25, PER-1, VEB-1
2br	A	ペニシリン系薬	無効	無効	クラブラン酸, スルバクタムおよびタゾバクタムに耐性	TEM-30, SHV-10
2ber	A	第二世代, 第三世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬	無効	無効	オキシミノセファロスポリン系薬の分解促進およびクラブラン酸, スルバクタムおよびタゾバクタムに耐性	TEM-50
2c	A	カルベニシリン	有効	無効	カルベニシリンの加水分解促進	PSE-1, CARB-3
2ce	A	カルベニシリンおよびセフェピム	有効	無効	カルベニシリン, セフェピムおよびセフピロムの加水分解促進	RTG-4
2d	D	クロキサシリン	不定	無効	クロキサシリンあるいはオキサシリンの加水分解促進	OXA-1, OXA-2, OXA-10
2de	D	第二世代, 第三世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬	不定	無効	クロキサシリン, オキサシリンあるいはオキシミノセファロスポリン系薬の加水分解促進	OXA-11, OXA-15
2df	D	カルバペネム系薬	不定	無効	カルバペネム系薬の加水分解促進	OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51
2e	A	第二世代, 第三世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬	有効	無効	セファロスポリン系薬を分解, クラブラン酸による阻害を受けるがアズトレオナムによる阻害は受けない	CepA
2f	A	カルバペネム系薬	不定	無効	カルバペネム系薬, オキシミノセファロスポリン系薬およびセファマイシン系薬の加水分解促進	SME-1, NMC-1, IMI-1, GES-1, KPC-2, KPC-3
3a	B (サブクラス B1) B (サブクラス B3)	カルバペネム系薬	無効	有効	カルバペネム系薬を含む広い基質特異性を有するが, モノバクタム系は分解しない	IMP-1, VIM-1, SPM-1, GIM-1, SIM-1, IND-1, CcrA L1, FEZ-1, Gob-1, CAU-1
3b	B (サブクラス B2)	カルバペネム系薬	無効	有効	カルバペネム系薬をよく加水分解	CphA, ImiS, Sfh-1

\*太字: 国内で複数の報告事例がある酵素名

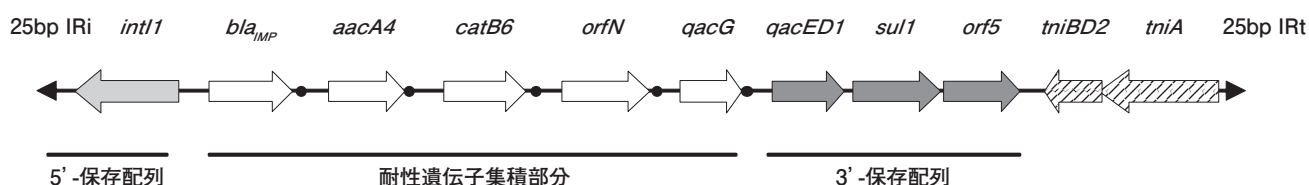


図1. MBL をコードする遺伝子 (*bla<sub>IMP</sub>*) の周辺構造

MBL をコードする *bla<sub>IMP</sub>* の下流には、アミノ配糖体系薬アセチル化酵素の *aacA4*、クロラムフェニコールアセチル化酵素遺伝子の *catB*、消毒薬である第四級アンモニウム塩耐性に関与するなどが纏まって存在する。このような遺伝子構造はインテグロンと呼ばれており、多剤耐性菌の出現と密接に関連していると考えられている。この図は、Laraki らが報告した論文 (Laraki N et al. Structure of In 31, a *bla<sub>IMP</sub>*-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In 5, which carries an unusual array of gene cassettes. Antimicrob Agents Chemother. 1999 ; 43 (4) : 890-901) に記載されている。

参加施設が置かれている状況などの複数の因子が関与していると思われる。imipenem 耐性緑膿菌の大多数はカルバペネマーゼを産生することにより imipenem 耐性を獲得したのではなく、塩基性アミノ酸の透過孔である OprD の発現量の低下あるいは欠損にその原因があることは言うまでもない。

イタリアで 2000 年から 2002 年に収集された 383 株の緑膿菌のうち、MBL を産生する菌株は 25 株 (6.5%) であった。このサーベイランスで検出された主要な MBL は VIM-1 であった。Cagnacci らは、S. Martino 大学病院において 2004 年 9 月から 2005 年 1 月までに血液由来検体から分離された 9 株の VIM-1 産生肺炎桿菌は PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis ; パルスフィールドゲル電気泳動) の結果から同一起源であることを明らかにした<sup>20)</sup>。さらに彼らは、この MBL 産生株と大腸菌を混合したところ、大腸菌に MBL をコードする遺伝子を保有するプラスミドが伝達されたと述べている。すなわち、この VIM-1 をコードする遺伝子も接合伝達により菌種を超えて伝達されることが明らかとなった。

ギリシャでは、2001 年から 2006 年までの僅か 5 年間で、imipenem 耐性株の分離頻度は 1% から 20% へと増加した<sup>21)</sup>。彼らは、血液から検出された肺炎桿菌のうち、37.6% の菌株が VIM-1 をコードする遺伝子を保有していたと報告しており、耐性菌急増の背景には MBL 産生菌の増加があると指摘している。

韓国の Yong らは、15,960 株の臨床材料から分離されたグラム陰性菌が保有する MBL の解析を実施している<sup>22)</sup>。収集された 581 株の imipenem 耐性緑膿菌のうち、36 株 (6.2%) が MBL を産生していた。その内訳は、IMP-1-like MBL が 2 株、VIM-2-like MBL が 34 株であった。一方、収集されたアシネトバクター属菌 513 株の中で、MBL 産生株は 136 株 (26.5%) であり、その内訳は VIM-2-like が 54 株 (64%)、IMP-1-like が 25 株 (29%)、そして韓国特有の SIM-like MBL が 6 株 (7%) の頻度で検出されていた。

日本では、IMP-1-like の検出率が最も高く、IMP-2-like および VIM-2-like の MBL も検出されている<sup>23)</sup>。2006 年までは VIM-1 産生菌に関する報告は日本からなされていなかったが、2006 年に神戸市立医療センター中央市民病院において VIM-1 産生緑膿菌が分離された<sup>24)</sup>。現在では、ブドウ糖非発酵菌である *Pseudomonas* spp. やアシネトバクター属菌、腸内細菌科の大腸菌、肺炎桿菌、*Serratia marcescens*、*Providencia rettgeri*、*Citrobacter freundii*、*Morganella morganii* など、MBL 産生菌は多岐にわたっている<sup>3)</sup>。約 8,000 株のグラム陰性菌を対象とした MBL 産生株に関する検討から、Kimura らは日本の臨床材料から分離されるグラム陰性菌は、その約 0.5% が MBL を産生しており、緑膿菌および *S. marcescens* のうち MBL を産生するのは、それぞれ 2.6% および 3% 程度であるとしている<sup>17)</sup>。

## MBL 以外のカルバペネマーゼの種類とその疫学

カルバペネム系薬を分解する酵素はグループ 3 に属する MBL だけではなく、グループ 2 に属するものの中にも存在する。グループ 2d の一部の  $\beta$ -ラクタマーゼおよびグループ 2f に属する酵素がそれである。グループ 2df は OXA-型  $\beta$ -ラクタマーゼであるが、OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51 および OXA-58 が属するファミリーがカルバペネマーゼとしての活性を有している<sup>15)</sup>。一方、グループ 2f に属する  $\beta$ -ラクタマーゼは Sme-型, NMC-型, IMI-型, KPC-型 および GES-型が知られており、これらはいずれも Ambler の分類ではクラス A に属している<sup>3,4)</sup>。

現在、グループ 2f に属するカルバペネマーゼの中で世界的拡散が問題となっているのが KPC-型酵素である。最初に発見された KPC-型酵素である KPC-1 は、ノースカロライナ州の医療施設において 1996 年に分離された、imipenem と meropenem に  $16 \mu\text{g/mL}$  の MIC 値を示す肺炎桿菌から発見された<sup>3)</sup>。本酵素名は *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase に因んで命名されている。その後、KPC-2 はメリーランド州やニューヨークで分離された肺炎桿菌や *Klebsiella oxytoca* から検出された。2008 年、KPC-1 として報告された DNA 塩基配列に誤りがあり、KPC-2 と配列が同一であることが明らかになった。米国で発見された KPC-型酵素産生菌は、その後コロンビア、中国、フランス、イスラエル、ノルウェー、スウェーデン、英国、ギリシャ、ブラジルの 10 カ国から次々と報告されている。KPC-型酵素産生菌は、肺炎桿菌のみならず *K. oxytoca* といった *Klebsiella* 属菌、*Enterobacter* 属菌、大腸菌、*S. marcescens*、*C. freundii*、*Proteus mirabilis* などの腸内細菌科に属する菌種、緑膿菌、*Pseudomonas putida* などのブドウ糖非発酵菌にまで広がりを見せている<sup>3,4)</sup>。KPC-型酵素産生株が注目されたのは、ニューヨークの病院におけるアウトブレイクが発端だった。このアウトブレイクは、2000 年 4 月から 2001 年 4 月の間にこの病院の ICU に入院していた 24 名の患者から KPC-3 産生肺炎桿菌が分離され、14 名 (58.3%) が同菌による感染症を発症し、そのうちの 8 名が死亡した<sup>25)</sup>。これら KPC-型酵素産生株の多くは、カルバペネム系薬に

対して  $8 \mu\text{g/mL}$  以上の MIC 値を示し、クラブラン酸やタゾバクタムなどの  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤に感性を示さず、さらにフルオロキノロン系薬、アミノ配糖体系薬など多くの抗菌薬に耐性を示した。感性を示したのは、ポリミキシン B およびテトラサイクリンであったとされている。通常、クラス A に属する酵素が  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤に感性を示すのとは異なる。次に報告されたアウトブレイクは、ニューヨークのブルックリン地区で 2004 年 9 月から 10 月までの 2 ヶ月間に発生したものだ。この期間に分離された 257 株の肺炎桿菌のうち、24% (62 株) に上る菌株が KPC-型酵素を産生しており、その多くが多剤耐性を示した<sup>26)</sup>。このように、KPC-型酵素産生株に関してもう一つ注意しなければならないことは、アウトブレイクの原因微生物となりうるということである。

グループ 2d に属する酵素間の相同性は 20% 程度のものもあるが、グループ 2d は多種多様な酵素から形成される酵素群である。古典的なグループ 2d に属する酵素は、オキサシリンを分解する速度がベンジルペニシリンを分解する速度と比較して速いという特徴はあるものの、分解可能な抗菌薬はペニシリン系薬に限られた酵素である<sup>16)</sup>。しかし、この中には ESBL (後述) やカルバペネマーゼ活性を有する酵素も含まれている。一方、このグループのカルバペネマーゼは、アシネトバクター属菌や緑膿菌が産生する。OXA-48 はカルバペネム系薬耐性緑膿菌から発見されたのに対して、OXA-23, OXA-24, OXA-51 あるいは OXA-58 といったグループのカルバペネマーゼはカルバペネム系薬耐性アシネトバクター属菌から見つかった<sup>15)</sup>。そして、OXA-型カルバペネマーゼ産生アシネトバクター属菌は多剤耐性を示す菌株が多いといわれている。日本でも、OXA-23 や OXA-51 産生株が見出されている<sup>27)</sup>。

## ESBL 産生菌の検出法

ESBL 産生株を検出する方法として、Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) が推奨するスクリーニング試験と確認試験が良く知られている (表 2-A, B)<sup>28)</sup>。CLSI は、両試験ともにディスク拡散法と液体微量希釈法を採用しており、スクリーニング試験では

表2. CLSI M100-S20, 2010 が推奨する ESBL のスクリーニング試験および表現型確認試験 (文献 28 を和訳)

A

試験	スクリーニング試験	表現型確認試験
試験法	ディスク拡散法	
使用培地	Mueller Hinton Agar	
抗菌薬濃度	肺炎桿菌, <i>K. oxytoca</i> , 大腸菌用 : セフポドキシム 10 $\mu$ g セフトラジジム 30 $\mu$ g アズトレオナム 30 $\mu$ g セフォタキシム 30 $\mu$ g セフトリアキソン 30 $\mu$ g } *  <i>P. mirabilis</i> 用 : セフポドキシム 10 $\mu$ g セフトラジジム 30 $\mu$ g セフォタキシム 30 $\mu$ g } *  (*検出感度向上には2種類以上の抗菌薬をスクリーニングに使う必要がある)	セフトラジジム 30 $\mu$ g セフトラジジム-クラブラン酸 30/10 $\mu$ g および セフォタキシム 30 $\mu$ g セフォタキシム-クラブラン酸 30/10 $\mu$ g 確認試験には, セフォタキシムおよびセフトラジジムの両薬剤の単独ディスクおよびクラブラン酸配合ディスクを使用しなければならない
菌接種法	ディスク拡散法で推奨される方法に従う	ディスク拡散法で推奨される方法に従う
培養条件	35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 好気	35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 好気
培養時間	16~18時間	16~18時間
結果判定	肺炎桿菌, <i>K. oxytoca</i> , 大腸菌用 : セフポドキシム阻止円 $\leq$ 17mm セフトラジジム阻止円 $\leq$ 22mm アズトレオナム阻止円 $\leq$ 27mm セフォタキシム阻止円 $\leq$ 27mm セフトリアキソン阻止円 $\leq$ 25mm  <i>P. mirabilis</i> 用 : セフポドキシム阻止円 $\leq$ 22mm セフトラジジム 阻止円 $\leq$ 22mm セフォタキシム阻止円 $\leq$ 27mm  上記の阻止円径を示した場合には, ESBL産生が示唆される	クラブラン酸配合ディスクの阻止円径が抗菌薬単独のものと比較して, 5mm以上拡張が認められれば, ESBL産生株とする (例: セフトラジジムの阻止円径=16mm, セフトラジジム-クラブラン酸の阻止円径=21mm)
報告		ESBL産生が確認された全菌株に対して, 全てのペニシリン系, セファロスポリン系, アズトレオナムに耐性であると報告しなければならない
精度管理	ESBLのスクリーニングに用いられる抗菌薬は, <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603株および <i>E. coli</i> ATCC25922で精度管理する  <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603 セフポドキシム 9~16mm セフトラジジム 10~18mm アズトレオナム 9~17mm セフォタキシム 17~25mm セフトリアキソン 16~24mm	ESBLのスクリーニングに用いられる抗菌薬は, <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603株および <i>E. coli</i> ATCC25922で精度管理する  <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603 セフトラジジム-クラブラン酸の阻止円径の拡張は $\geq$ 5mm, セフォタキシム-クラブラン酸の阻止円径の拡張は $\geq$ 3mm

B

試験	スクリーニング試験	表現型確認試験
試験法	液体微量希釈法	
使用培地	Mg, Ca調整済みMueller Hinton Broth	
抗菌薬濃度	肺炎桿菌, <i>K. oxytoca</i> , 大腸菌用: セフポドキシム 4 μg/mL セフトリタジム 1 μg/mL アズトレオナム 1 μg/mL セフォタキシム 1 μg/mL セフトリアキソン 1 μg/mL } *  <i>P. mirabilis</i> 用: セフポドキシム 1 μg/mL セフトリタジム 1 μg/mL セフォタキシム 1 μg/mL } *  (*検出感度向上には2種類以上の抗菌薬をスクリーニングに使う必要がある)	セフトリタジム 0.25-128 μg/mL セフトリタジム-クラバン酸 0.25/4-128/4 μg/mL <b>および</b> セフォタキシム 0.25-128 μg/mL セフォタキシム-クラバン酸 0.25/4-128/4 μg/mL 確認試験には, セフォタキシムおよびセフトリタジムの両薬剤単独および4 μg/mLのクラバン酸存在下での抗菌薬希釈系列を使用しなければならない
菌接種法	液体微量希釈法で推奨される方法に従う	液体微量希釈法で推奨される方法に従う
培養条件	35±2℃, 好気	35±2℃, 好気
培養時間	16~20時間	16~20時間
結果判定	スクリーニングで使用される抗菌薬濃度以上のウェルで菌の発育が認められた場合, ESBL産生が示唆される (例: 大腸菌, 肺炎桿菌, <i>K. oxytoca</i> ; セフポドキシムに対するMIC値が≥8 μg/mL, セフトリタジム, アズトレオナム, セフォタキシム, セフトリアキソンに対するMIC値が2 μg/mL, <i>P. mirabilis</i> ; セフポドキシム, セフトリタジム, セフォタキシムに対するMIC値が≥2 μg/mL)	クラバン酸存在下のMIC値が抗菌薬単独のものと比較して, 3管以上の改善が認められれば, ESBL産生株とする (例: セフトリタジムのMIC値=8 μg/mL, セフトリタジム-クラバン酸のMIC値=1 μg/mL)
報告		ESBL産生が確認された全菌株に対して, 全てのペニシリン系, セファロスポリン系, アズトレオナムに耐性であると報告しなければならない
精度管理	ESBLのスクリーニングに用いられる抗菌薬は, <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603株および <i>E. coli</i> ATCC25922で精度管理する  <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603 セフポドキシム ≥8 μg/mL セフトリタジム ≥2 μg/mL アズトレオナム ≥2 μg/mL セフォタキシム ≥2 μg/mL セフトリアキソン ≥2 μg/mL	ESBLのスクリーニングに用いられる抗菌薬は, <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603株および <i>E. coli</i> ATCC25922で精度管理する  <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603 抗菌薬にクラバン酸添加時のMIC値が, 抗菌薬単独のMIC値と比較して3管以上改善する

オキシミノセファロスポリンあるいはアズトレオナムに感性を示さない菌株を選択し、確認試験ではクラブラン酸によりその感性が回復することを利用している(図2)。2010年に発行されたCLSIのM100-S20で、セファロスポリン系薬のブレイクポイントが変更された。しかし、ESBLの検出法にはこれまでの方法がそのまま記載されている。2011年以降、ESBLの検出方法が削除される可能性はあるものの、今後も疫学調査や感染管理を実施する際には必要な検査であり続けると考えている。英国ではCLSIが推奨する方法とは若干異なる基準が用いられている(<http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/qsop/pdf/qsop51.pdf>)。他にもEtestを用いる方法(図3)や発色基質を利用した特殊な培地(ChromID ESBL; シスメックス・ビオメリュー社)を

用いたスクリーニング法(図4)などがある<sup>29, 30)</sup>。

詳細なESBLの型別を実施するためには、PCRおよびPCR産物のDNA塩基配列決定が必要となる。筆者らは表3に示したMultiplex PCRによる方法<sup>31)</sup>でCTX-M型に属するβ-ラクタマーゼを網羅的に検出している。なお、この方法ではNaganoらが報告したCTX-M-64を検出することができないため、すべてのCTX-M型β-ラクタマーゼを検出するための共通プライマーを用いなければならない<sup>32)</sup>。一方、PCRで検出されたTEM型やSHV型β-ラクタマーゼは、DNA塩基配列を決定しなければ、ESBLか否かを判別することはできない。また、表3にはプラスミド性AmpC検出で著者らが用いているmultiplex PCR用のプライマー<sup>33)</sup>も示している。

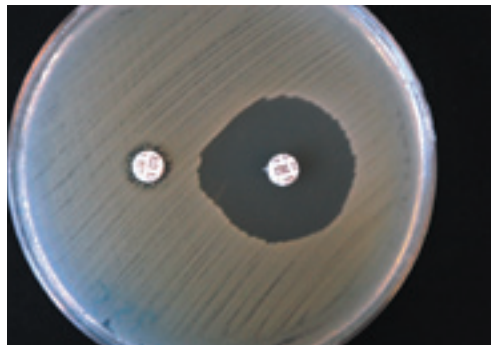


図2. CLSIが推奨するディスク拡散法による基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生株(ESBL)の検出例

ESBLの一種であるCTX-M-44を産生する大腸菌を対象に実施した。本菌株はセフトキシムディスク(左側)周辺には阻止帯は認められないが、セフトキシムにクラブラン酸を配合されたディスク(右側)周囲には大きな阻止帯が認められる。



図3. ESBL検出用EtestによるESBL産生菌の検出例

ESBLの一種であるCTX-M-44を産生する大腸菌を対象に実施した。本菌株はESBL検出用Etestストリップのセフトキシム(上部右側)周辺には阻止帯は認められないが、セフトキシムとクラブラン酸が配合されたストリップ部分(上部左側)周囲には大きな阻止帯が認められる。下部のESBL検出用Etest周囲には、セフトキシム部分の周囲に認められる阻止帯は小さく、それと比較するとセフトキシムとクラブラン酸が配合されたストリップ部分にはそれと比較して大きな阻止帯を認める。

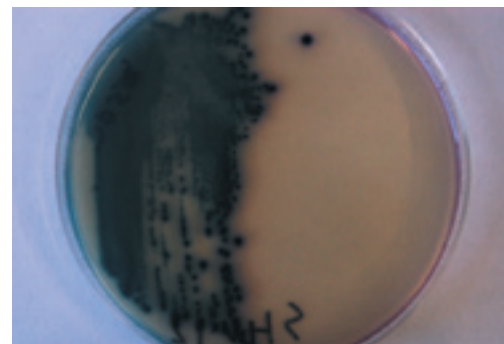


図4. ESBL検出用chrom ID ESBLによるESBL産生菌の検出例

ESBLの一種であるSHV-12を産生する大腸菌を対象に実施した。本菌株はESBL検出用クロモアガーに発育することからESBL産生株であることが確認される。また、コロニーが青色を呈することから大腸菌であると判定される。



表3. β-ラクタマーゼ関連遺伝子検出用 PCR プライマー

検出対象酵素	プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	増幅断片長 (bp)	文献	
<u>クラスA CTX-M-型ESBL</u>					
グループ 1	CTXM7	GCGTGATACCACTTCACCTC	260	31	
	CTXM8	TGAAGTAAGTGACCAGAATC			
グループ 2	CTXM17	TGATACCACCACGCCGCTC	341		
	CTXM18	TATTGCATCAGAAACCGTGGG			
グループ 8/25/26	CTXM19	CAATCTGACGTTGGGCAATG	207		
	CTXM20	ATAACCGTCGGTGACAATT			
グループ 9	CTXM11	ATCAAGCCTGCCGATCTGGTTA	293		
	CTXM12	GTAAGCTGACGCAACGTCTGC			
<u>クラスA カルバペネマーゼ</u>					
NMC	NMC1	GCATTGATATACCTTTAGCAGAGA	2,158		41
	NMC4	CGGTGATAAAATCACACTGAGCATA			
SME	IRS-5	AGATAGTAAATTTTATAG	1,138	3	
	IRS-6	CTCTAACGCTAATAG			
IMI	IMI-A	ATAGCCATCCTTGTTTAGCTC	818	40	
	IMI-B	TCTGCGATTACTTTATCCTC			
KPC	KPC forward	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893	38	
	KPC reverse	TTTTTCAGAGCCTTACTGCC			
GES	GES-C	GTTTTGCAATGTGCTCAACG	371	42	
	GES-D	TGCCATAGCAATAGGCCGTAG			
<u>クラスBメタロβラクタマーゼ</u>					
IMP-1	Forward	TGAGCAAGTTATCTGTATTC	740	49	
	Reverse	TTAGTTGCTTGGTTTTGATG			
IMP-2	Forward	GGCAGTCGCCCTAAAACAAA	737		
	Reverse	TAGTTACTTGGCTGTGATGG			
VIM-1	Forward	TTATGGAGCAGCAACCGATGT	920		
	Reverse	CAAAAGTCCCGCTCCAACGA			
VIM-2	Forward	AAAGTTATGCCGCACTCACC	865		
	Reverse	TGCAACTTCATGTTATGCCG			
SPM-1	SPM-1F	CCTACAATCTAACGGCGACC	650		
	SPM-1R	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC			
GIM-1	GIM-1F	AGAACCTTGACCGAACGCAG	748	46	
	GIM-1R	ACTCATGACTCCTCACGAGG			
SIM-1	SIM1-F	TACAAGGGATTCCGGCATCG	571	47	
	SIM1-R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG			
<u>インテグラーゼ遺伝子</u>					
intl1	F6	GCATCCTCGGTTTTTCTGG	457	48	
	R6	GGTGTGGCGGGCTTCGTG			
intl2	F7	CACGGATATGCGACAAAAGGT	789		
	R7	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
intl3	F8	ATCTGCCAAACCTGACTG	922		
	R8	CGAATGCCCAACAACCTC			
<u>プラスミド性クラスCβラクタマーゼ</u>					
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8~CMY-11	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520		33
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC			
LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1	CITMF	TGGCCAGAAGTACAGGCAAA	462		
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC			
DHA-1, DHA-2	DHAMF	AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405		
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC			
ACC	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346		
	ACCMR	TTCCGCGCAATCATCCCTAGC			
MIR-1, ACT-1	EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302		
	EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT			
FOX-1~FOX-5b	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190		
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG			
<u>クラスDカルバペネマーゼ (A. baumannii)</u>					
OXA-51-like		TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	43	
OXA-23-like		TGGATTGCACTTCACTTTGG	501		
OXA-24-like		GATCGGATTGGAGAACCAGA	246		
OXA-24-like		ATTTCTGACCGCAATTTCCAT	599		
OXA-58-like		GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA			
OXA-58-like		AGTTGAGCGAAAAGGGGATT			
OXA-58-like		AAGTATTGGGGCTTGTGCTG			
OXA-58-like		CCCCTCTGCGCTCTACATAC			
<u>IS<sub>Aba</sub> 配列</u>					
IS <sub>Aba1</sub>	IS <sub>Aba1B</sub>	CATGTAAACCAATGCTCACC	44	50	
IS <sub>Aba2</sub>	IS <sub>Aba2A</sub>	AATCCGAGATAGAGCGGTTT			
IS <sub>Aba2</sub>	IS <sub>Aba2B</sub>	TGACACATAACCTAGTGAC			
IS <sub>Aba3</sub>	IS <sub>Aba3A</sub>	CAATCAAATGTCCAACCTGC			
IS <sub>Aba3</sub> (特異的)	IS <sub>Aba3B</sub>	CGTTTACCCCAAACATAAGC			
IS <sub>Aba3</sub> -likeおよびIS <sub>Aba3</sub>	IS <sub>Aba3C</sub>	AGCAATATCTCGTATACCGC			
IS <sub>Aba4</sub>	IS <sub>Aba4A</sub>	ATTTGAACCCATCTATTGGC			

## KPC-型β-ラクタマーゼ産生菌の検出法

KPC-型β-ラクタマーゼ産生菌のβ-ラクタム系薬に対するMIC値は、接種菌量の影響を強く受けることが知られている<sup>26)</sup>。すなわち、接種菌量が少ない場合、カルバペネム系薬に対するMIC値が感性となってしまう。さらに、対象とするカルバペネム系薬の種類によって、KPC-型β-ラクタマーゼの検出感度は大きく違ってくる。Ertapenemを用いるとKPC-型酵素産生株を効率よく検出できるが、日本では入手が困難であるためmeropenemを用いる。imipenemを用いてKPC-型酵素産生株をディスク法でスクリーニングする場合、その感度は低いとされている<sup>34, 35)</sup>。CLSIが推奨する腸内細菌科に属する菌が産生するKPC-型カルバペネマーゼの検出法を表4に示した<sup>28)</sup>。CLSIはKPC-型β-ラクタマーゼ産生菌の確認試験としてModified Hodge testによる方法を推奨している。Hodge testとは、1978年にHodgeらによって開発された、淋菌が産生するβ-ラクタマーゼを簡便に検出する方法である<sup>23)</sup>。原法は、*Staphylococcus aureus* ATCC25923を寒天培地に塗布した培地上にペニシリンG含有ディスクを貼付し、ディスク周辺部から外側に被検菌を画線するというものであった。それをLeeらが、*Pseudomonas*と*Acinetobacter*属菌が産生するMBLを検出するために、培地上に塗布する菌株を*Escherichia coli* ATCC25922に変更した方法を、2001年にModified Hodge testとして報告した<sup>36)</sup>。Hodge testは、Thomson & Sandersによって報告されたThree-Dimensional test<sup>37)</sup>、EDTA-disk synergy testなどと比較すると、細菌検査室で新たな資材や機器を購入することなく実施可能な簡便な方法であるといえる。CLSIが推奨するModified Hodge testでKPC-型酵素産生株を検出する場合、ertapenemディスクあるいはmeropenemディスクを用い、塗布する*E. coli* ATCC25922はMcFarland No. 0.5に調整した懸濁液をさらに10倍希釈した菌液を用いなければならない(図5)。Modified Hodge testの対象となる菌株は、cefotaxime, ceftazidimeあるいはceftriaxoneに耐性を示し、ertapenem, imipenem, meropenemのMIC値が2μg/mL, 2~4μg/mL, 2~4μg/mLの

菌株である。Modified Hodge testが陽性であった菌株のカルバペネム系薬に対するMIC値が感性[S]と判定された場合の報告は、(1)カテゴリーを報告せずにMIC値のみ報告する、(2)MIC値を報告せずカテゴリーを[R]または[I]として報告することを推奨している。カルバペネム系薬に対するカテゴリーが[R]あるいは[I]の菌株は、Modified Hodge testの対象にはならないとCLSIは記載している<sup>28)</sup>。Doiらはボロン酸を用いた方法について検討し、良好な結果を得たと報告している<sup>34)</sup>。ボロン酸はグループ3に属するβ-ラクタマーゼ、いわゆるAmpCの阻害剤であることから、AmpCを産生する菌種におけるKPC-型酵素産生の有無の確認には不向きであると思われる。

PCRでもKPC-型酵素をコードする遺伝子を検出することは可能であるが、詳細な遺伝子型はDNA塩基配列決定が必要である。PCRで使用されるプライマーは、他のクラスAに属するカルバペネマーゼ検出用プライマーとともに表3に示している<sup>38~42)</sup>。

## OXA-型カルバペネマーゼ産生菌の検出法

ある種のOXA-型β-ラクタマーゼは、塩化ナトリウムあるいはクラブラン酸などで阻害されると報告されているが<sup>15)</sup>、すべての酵素に対する阻害剤やカルバペネマーゼ活性を有する酵素に対する阻害剤は存在しない。表現系をもとにした各種β-ラクタマーゼの検出法は、薬剤感受性試験結果と特異的阻害剤に対する感受性をもとにするため、阻害剤が存在しないOXA-型β-ラクタマーゼを、薬剤感受性成績をもとに検出する方法は現時点まで報告されていない。筆者らは主要なカルバペネマーゼに対する特異抗体を利用して、イムノクロマト法で各OXA-型カルバペネマーゼを検出する系を構築している。カルバペネム系薬に感性を示さず、かつMBLが検出されない菌株に対しては、イムノクロマト法などでOXA-型カルバペネマーゼを検出している。もちろん、OXA-型カルバペネマーゼをコードする遺伝子は、PCR法による検出も可能である。筆者らは表3に示したmultiplex PCR用プライマー<sup>43)</sup>も併用している。

表4. CLSI M100-S20, 2010 が推奨する腸内細菌科に属する菌が産生するカルバペネマーゼのスクリーニング試験および表現型確認試験 (文献8を和訳)

試験	スクリーニング試験		表現型確認試験
どのような場合に本試験を実施するのか			スクリーニング試験が陽性で1つ以上の第三世代セフェム系薬に耐性を示した場合
試験法	ディスク拡散法	微量液体希釈法	Modified Hodge test
培地	MHA	CAMHB	MHA
抗菌薬濃度	エルタペネム 10 $\mu$ g または メロペネム 10 $\mu$ g (イミペネムディスクはカルバペネマーゼのスクリーニング試験には適さない)	エルタペネム1 $\mu$ g/mL または イミペネム1 $\mu$ g/mL または メロペネム1mg/mL	エルタペネム ディスク 10 $\mu$ g または メロペネム ディスク 10 $\mu$ g
接種法	ディスク拡散法に従う	微量液体希釈法に従う	1) 指標菌として <i>E. coli</i> ATCC25922株の0.5McFarland懸濁液を準備し、これを液体培地あるいは生理食塩液で10倍希釈したものを接種菌液とする。通常のディスク拡散法に従って、MHAに塗沫して、3~10分培地表面を乾燥させる。培地上の適切な位置にエルタペネムあるいはメタペネムを配置する。 2) 10- $\mu$ Lのループあるいは滅菌綿棒を用いて、3~5コロニーの血液寒天培地上に発育した被検菌株および精度管理株をディスクの辺縁から外側に向かって、20~25mm以上画線する。
培養条件	35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 好気	35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 好気	35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 好気
培養時間	16~18時間	16~20時間	16~20時間
結果	エルタペネム19~21mm メロペネム16~21 mm カテゴリーが[S]を示しても、カルバペネマーゼ産生株の可能性はある。 Modified Hodge testを確認試験として実施する。(イミペネムディスクはカルバペネマーゼのスクリーニング試験には適さない)	エルタペネム 2 $\mu$ g/mL イミペネム 2~4 $\mu$ g/mL メロペネム 2~4 $\mu$ g/mL カテゴリーが[S]を示しても、カルバペネマーゼ産生株の可能性はある。 Modified Hodge testを確認試験として実施する。	培養後、MHA培地に画線した被検菌株および精度管理株と阻止円辺縁の指標菌の発育を確認する。 発育促進有：カルバペネマーゼ産生 陽性 発育促進無：カルバペネマーゼ産生 陰性 菌株によっては、 <i>E. coli</i> ATCC25922の発育阻害物質を産生して画線部分の周辺にクリアゾーンが出現することがある。このような菌株がカルバペネマーゼを産生するか否かの判定はmodified Hodge testで行うことはできない。
報告			Modified Hodge test陽性でカルバペネム系薬に感性(エルタペネム MIC $\leq$ 2 $\mu$ g/mL ; イミペネム MIC $\leq$ 4 $\mu$ g/mL ; メロペネム MIC $\leq$ 4 $\mu$ g/mL)を示した菌株については、カルバペネム系薬のカテゴリーは報告せず、次のようにコメントする：「この菌株はカルバペネマーゼを産生することが確認されている。このような <i>in vitro</i> においてカルバペネマーゼを産生することが確認されているカルバペネム系薬感性腸内細菌科(エルタペネム MIC $\leq$ 2 $\mu$ g/mL ; イミペネム MIC $\leq$ 4 $\mu$ g/mL ; メロペネム MIC $\leq$ 4 $\mu$ g/mL)に対するカルバペネム系薬による治療効果は確認されていない。」 Modified Hodge testの結果が陰性となった場合、カルバペネム系薬に対するMICブレイクポイントは、通常のCLSIのクライテリアに従う。
精度管理株	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>E. coli</i> ATCC25922	試験実施日にカルバペネマーゼ陽性株および陰性株を用いた精度管理を実施する。 -modified Hodge test 陽性- <i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1705 -modified Hodge test 陰性- <i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706

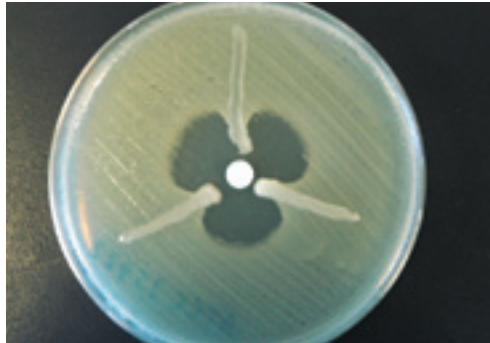


図5. CLSIが推奨する modified Hodge test によるクラス A に属するカルバペネム系薬加水分解酵素産生株の検出例 (M100-S20 参照)

McFarland No. 0.5 に調整した *E. coli* ATCC25922 をさらに 10 倍希釈した上で、培地表面に塗抹し、培地中央部にはエルタペネムディスクを貼付した。供試菌株として KPC-2 産生肺炎桿菌 (下部左側)、KPC-3 産生大腸菌 (下部右側) および CTX-M-44 産生大腸菌 (上部) を用いた。KPC-2 産生肺炎桿菌 (下部左側) および KPC-3 産生大腸菌 (下部右側) を画線された供試菌株に沿って明らかな阻止円の変形 (クローバー葉の凹) が認められる。画線部分に沿ってこの変形を認めた場合、供試菌株が中央に貼付した抗菌薬を不活化していることが確認される。この場合は、画線された KPC-2 産生肺炎桿菌および KPC-3 産生大腸菌がエルタペネムを不活化 (加水分解) したことが確認された。後述の方法で、画線された菌株が MBL を産生しないことが確認されれば、供試菌株はクラス B 以外の  $\beta$ -ラクタマーゼ (腸内細菌科に属する菌の場合はクラス A に属する酵素である可能性が高い) 産生株であることが示唆される。なお、上部の CTX-M-44 産生大腸菌の画線部周囲にも、僅かではあるがクローバー葉の様な形が認められる。CTX-M-44 はカルバペネム系薬をゆっくりではあるが、分解する能力を有しているからである。

しかし注意すべきは、アシネトバクター属菌から遺伝子が検出されても、それが直接カルバペネマーゼ産生とは結びつかないことである。すなわち、OXA-型カルバペネマーゼ産生には、その構造遺伝子の他に特殊な挿入配列を必要とする酵素が多い<sup>3, 15)</sup>。例えば、*A. baumannii* は、すべての菌株がその染色体上に OXA-51-like カルバペネマーゼをコードする遺伝子 (*bla*<sub>OXA-51-like</sub>) を保有しているが、多くの *A. baumannii* は OXA-51-like カルバペネマーゼを産生せず、産生する菌株は *bla*<sub>OXA-51-like</sub> の上流に *ISAbal* と呼ばれる挿入配列を有している。また、OXA-23 および OXA-58 も *ISAbal*, *ISAbal2*, *ISAbal3*, *ISAbal3-like* あるいは *ISAbal4* といった挿入配列が必要であるとされている。したがって、PCR によって OXA-型カルバペネマーゼを検出する際は、OXA-型カルバペネマーゼの構造遺伝子の検出とともに、上流に挿入配

列が存在するか否かを検索することが必要となる。*ISAbal* ~ *ISAbal4* と OXA-型カルバペネマーゼとの関連性を確認するために必要な PCR 用プライマー<sup>44)</sup> を表 3 に示している。

## MBL 産生菌の検出法

MBL の表現系をもとにした検出法では、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) やメルカプト酢酸ナトリウム、メルカプトプロピオン酸、ジピコリン酸などのキレート剤の存在下でその活性を失うという性質が利用される<sup>3, 45)</sup>。日本で汎用されている、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ SMA' 栄研' (栄研化学社) はメルカプト酢酸ナトリウム (図 6) を、Etest MBL (シスメックス・バイオメリュー社) は EDTA (図 7) をそれぞれキレート剤として利用している。なお、imipenem

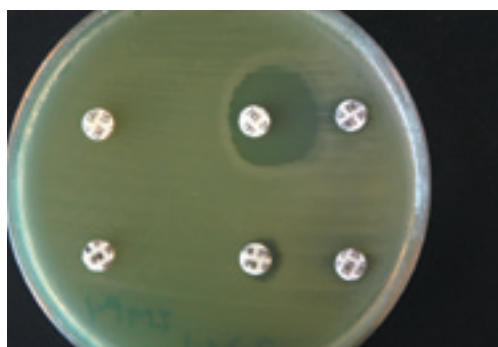


図6. メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ SMA'栄研'による MBL 産生菌の検出例

MBL の一種である IMP-1 を産生する緑膿菌を対象に実施した。本菌株は、イミペネムディスクおよびセフトジジムディスク周囲に阻止円を認めないが、SMA に近接したイミペネムディスクおよびセフトジジムディスク周囲に阻止円の拡張を認める。この事実から本菌株が MBL を産生すると判定される。



図7. MBL 検出用 Etest による MBL 産生菌の検出例

MBL の一種である IMP-1 を産生する緑膿菌を対象に実施した。本菌株は、Etest のイミペネム単独部分の周囲に阻止帯を認めないが、EDTA が配合された部分周囲に阻止帯を認める。この事実から本菌株が MBL を産生すると判定される。

および ceftazidime が MBL の検出目的で使用されるが、産生される MBL の特性により、imipenem で検出しやすいものと ceftazidime で検出しやすいものがある。したがって、筆者らは MBL の検出には両薬剤を用いることが必要であると考えている。

PCR で MBL をコードする遺伝子を検出することは可能である。しかし、次々と新たな MBL が発見されている現在、臨床材料から分離された菌株が産生するすべての MBL を PCR で検出することは困難である。主要な MBL を検出する際に PCR で使用されるプライマーを表 3 に示している<sup>46~48)</sup>。また、上述のように MBL 産生株が多剤耐性を示すことは良く知られている。その理由はインテグロンと呼ばれる特殊な遺伝子構造中に、MBL をコードする遺伝子を含む多数の薬剤耐性遺伝子が存在するためである。表 3 には Shibata らが報告したインテグロン構造解析に有用なプライマーも示している<sup>48)</sup>。

## おわりに

各種  $\beta$ -ラクタマーゼの特長およびその検出法に関して述べてきた。分子生物学の進歩に伴い、PCR 法をもとにした遺伝子検出技術の発達には目覚ましいものがある。しかし、PCR 法による遺伝子検査に頼りすぎると、時として誤った情報を伝えてしまうことがある。筆者は、耐性菌の検出には薬剤感受性試験成績をもとに確認する方法が、現時点における最善の方法であると考えている。検査室の情報がベッドサイドで有効利用されるためには、検査室では正しい検体を採取、正しい原因菌の分離培養、正しい薬剤感受性試験が重要である。そのためには臨床医と検査技師の連携が必要不可欠であると考えている。

参考文献

- 1) Jacoby GA.  $\beta$ -lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 ; 50 ( 4 ) : 1123-1129.
- 2) Ishii Y, Tateda K, Yamaguchi K. Evaluation of antimicrobial susceptibility for  $\beta$ -lactams using the Etest method against clinical isolates from 100 medical centers in Japan ( 2006 ). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 ; 60 ( 2 ) : 177-183.
- 3) Queenan AM, Bush K. Carbapenemases : the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007 ; 20 ( 3 ) : 440-458.
- 4) Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009 ; 9 ( 4 ) : 228-236.
- 5) Canton R, Coque TM. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006 ; 9 ( 5 ) : 466-475.
- 6) Livermore DM and Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006 ; 14 ( 9 ) : 413-420.
- 7) Cagnacci S et al. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25 : H4-ST 131 and O15 : K52 : H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *J Clin Microbiol.* 2008 ; 46 ( 8 ) : 2605-2612.
- 8) Karisik E et al. Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2008 ; 61 ( 1 ) : 54-58.
- 9) Lavollay M et al. Clonal dissemination of a CTX-M-15  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 ; 50 ( 7 ) : 2433-2438.
- 10) Livermore DM et al. CTX-M : changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007 ; 59 ( 2 ) : 165-174.
- 11) Pitout JD et al. Molecular characteristics of travel-related extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from the Calgary Health Region. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 ; 53 ( 6 ) : 2539-2543.
- 12) Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae : an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.* 2008 ; 8 ( 3 ) : 159-166.
- 13) Woodford N et al. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499 and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25 : H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 ; in press.
- 14) Suzuki S et al. Change in the prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother.* 2009 ; 63 ( 1 ) : 72-79.
- 15) Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2006 ; 57 ( 3 ) : 373-383.
- 16) Bush K, Jacoby GA. An updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 ; in press.
- 17) Kimura S et al. Clonal diversity of metallo- $\beta$ -lactamase-possessing *Pseudomonas aeruginosa* in geographically diverse regions of Japan. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43 ( 1 ) : 458-461.
- 18) Sekiguchi J et al. 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.* 2005 ; 49 ( 9 ) : 3734-3742.
- 19) Turner PJ. MYSTIC ( Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection ) : a global overview. *J Antimicrob Chemother.* 2000 ; 46 ( Suppl T2 ) : 9-23.
- 20) Cagnacci S et al. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase : first Italian outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2008 ; 61 ( 2 ) : 296-300.
- 21) Vatopoulos A. High rates of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece -a review of the current evidence. *Euro Surveill.* 2008 ; 13 ( 4 ) : 1-6.
- 22) Yong D et al. Increasing prevalence and diversity of metallo- $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and Enterobacteriaceae from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 ; 50 ( 5 ) : 1884-1886.
- 23) Hodge W, Ciak J, Tramont EC. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 1978 ; 7 ( 1 ) : 102-103.
- 24) 三木寛二 他 . VIM-1 型メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生緑膿菌の集団分離事例の検討 . 第 20 回日本臨床微生物学雑誌 . 2009 ; 18 ( 4 ) : 115.
- 25) Woodford N et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolysing class A  $\beta$ -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 ; 48 ( 12 ) : 4793-4799.

- 26) Bratu S et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York : epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 ; 49 ( 7 ) : 3018-3020.
- 27) 中村竜也 他 . OXA 型 Carbapenemase を産生する Multi-Drug Resistant *A. baumannii* の検出について . 第 20 回日本臨床微生物学会雑誌 . 2009 ; 18 ( 4 ) : 109.
- 28) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twentieth Informational Supplement. M100-S20, 29. Wayne, PA : CLSI ; 2010.
- 29) M'Zali FH et al. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family enterobacteriaceae : comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother.* 2000 ; 45 ( 6 ) : 881-885.
- 30) Reglier-Poupet H et al. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Med Microbiol.* 2008 ; 57 ( Pt 3 ) : 310-315.
- 31) Xu L et al. Rapid and simple detection of *bla*<sub>CTXM</sub> genes by multiplex PCR assay. *J Med Microbiol.* 2005 ; 54 ( Pt 12 ) : 1183-1187.
- 32) Nagano Y et al. Novel chimeric  $\beta$ -lactamase CTX-M-64, a hybrid of CTX-M-15-like and CTX-M-14  $\beta$ -lactamases, found in a *Shigella sonnei* strain resistant to various oxyimino-cephalosporins, including ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 ; 53 ( 1 ) : 69-74.
- 33) Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 ; 40 ( 6 ) : 2153-2162.
- 34) Doi Y et al. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type  $\beta$ -lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol.* 2008 ; 46 ( 12 ) : 4083-4086.
- 35) Pasteran F et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2009 ; 47 ( 6 ) : 1631-1639.
- 36) Lee K et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 2001 ; 7 ( 2 ) : 88-91.
- 37) Thomson KS, Sanders CC. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* : comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 ; 36 ( 9 ) : 1877-1882.
- 38) Bradford PA et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30  $\beta$ -lactamases in New York City. *Clin Infect Dis.* 2004 ; 39 ( 1 ) : 55-60.
- 39) Queenan AM et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 ; 44 ( 11 ) : 3035-3039.
- 40) Aubron C et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U. S. rivers. *Emerg Infect Dis.* 2005 ; 11 ( 2 ) : 260-264.
- 41) Radice M et al. First class a carbapenemase isolated from *enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 ; 48 ( 3 ) : 1068-1069.
- 42) Weldhagen GF, Prinsloo A. Molecular detection of GES-2 extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pretoria, South Africa. *Int J Antimicrob Agents.* 2004 ; 24 ( 1 ) : 35-38.
- 43) Woodford N et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 ; 27 ( 4 ) : 351-353.
- 44) Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 ; 50 ( 4 ) : 1442-1448.
- 45) Walsh TR et al. Metallo- $\beta$ -lactamases : the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005 ; 18 ( 2 ) : 306-325.
- 46) Castanheira M et al. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>GM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 ; 48 ( 12 ) : 4654-4661.
- 47) Lee K et al. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>SM-1</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 ; 49 ( 11 ) : 4485-4491.
- 48) Shibata N et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 ( 12 ) : 5407-5413.

---

49) JING-JOU Y et al. Metallo- $\beta$ -Lactamases in Clinical Pseudomonas Isolates in Taiwan and Identification of VIM-3, a Novel Variant of the VIM-2 Enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001 Aug ; 45 (8) : 2224–2228.

50) Corvec S et al. Genetics and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007 ; 51 (4) : 1530-1533.

---

## **Topics of $\beta$ -lactamases in the Gram-negative Bacteria and their Detection Systems - Including the Clinical and Laboratory Standards Institute recommended methods (M100-S20) -**

Yoshikazu ISHII

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Toho University School of Medicine,  
5-21-16 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8540

**Key Words**

$\beta$ -lactamase, Carbapenemase, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, Detection Methods, M100-S20

---