

## 腸内細菌科細菌を中心とした多剤耐性菌の薬剤耐性検査方法について

## 1. 多剤耐性菌と抗菌薬

フレミングが世界最初の抗生物質であるペニシリンを発見してから 100 年近く経過した今日までの間に、数多くの抗菌薬が開発されてきた。その一方で、それらに対する耐性菌がその都度出現し、細菌感染症の治療において極めて重大な問題となっている。特に、抗菌薬による治療が実施される医療現場では、院内感染対策など耐性菌に関する多くの課題に直面している。

腸内細菌科細菌(肺炎桿菌、大腸菌、サルモネラ等)には、基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ(ESBL)を産生し、セフトラジウム(CAZ)やセフトキシム(CTX)といった第二世代以降のセファロスポリン系抗菌薬を分解する菌が 2000 年代から増え始めていたが、近年ではグラム陰性桿菌に対して最終世代とされるカルバペネム系抗菌薬(イミペネム:IMP)、メロペネム:MEPM などに対する耐性菌も出現し、その報告例は年々増え続けている。

2014 年 9 月の感染症法改正<sup>1)</sup>にともない、5 類全数把握疾患として新たに「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症」「薬剤耐性アシネトバクター感染症」が指定された。すでに定点把握疾患として指定されている「バンコマイシン耐性腸球菌感染症」「薬剤耐性緑膿菌感染症」などと同様に、分離された菌の抗菌薬存在下における発育の可否(最少発育阻止濃度【MIC 値】もしくは感受性ディスクの阻止円の大きさ)が届出基準として採用されている。一方で、菌に薬剤耐性を与える分子機構は複雑であり、セファロスポリン系やカルバペネム系抗菌薬を分解する  $\beta$ -ラクタマーゼの産生能を遺伝子により獲得する場合だけでなく、細胞壁の抗菌薬に対する通過性の低下や、菌体内から抗菌薬を排出するポンプ能力の増強などがある。このうち、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子はプラスミドやファージなどを介して菌から菌へと伝播する可能性をはらんでいるため、国内外で耐性菌の遺伝子保有状況の調査が行

われている。

2. 複数の  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の同時保有による薬剤耐性化機構の複雑化

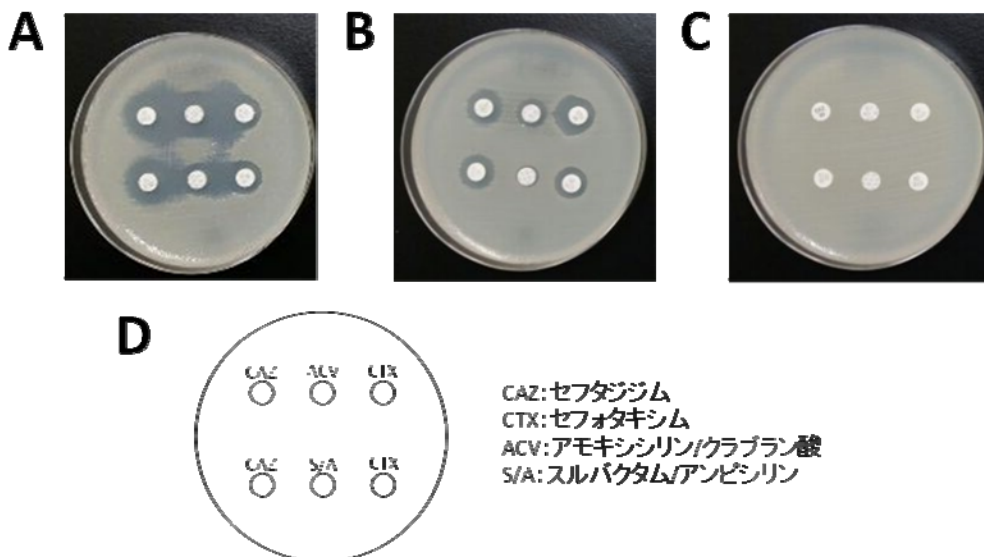
現在、IMP 型、VIM 型、KPC 型、NDM 型といったカルバペネマーゼ遺伝子が広まりつつあるが、以前より TEM 型、SHV 型、CTX-M 型などセファロスポリンを分解するクラス A  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の存在が知られ、腸内細菌科細菌における保有状況が調べられている。これらクラス A  $\beta$ -ラクタマーゼは、クラブラン酸などの  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤によって分解能が阻害されることから、同遺伝子を保有する耐性菌で本来耐性をもたず CAZ や CTX であっても、クラブラン酸存在下では発育が妨げられる。このため、抗菌薬およびクラブラン酸のディスクを同時に用いることで、クラス A  $\beta$ -ラクタマーゼの存在を確認することができる。

しかし、クラス A  $\beta$ -ラクタマーゼだけでなく、カルバペネマーゼ遺伝子を同時に保有する菌に対しては、このような検出法が困難になっている。というのも、カルバペネマーゼは基本的にカルバペネム系抗菌薬のみならず、セファロスポリン系をも分解するものが多く、クラス A  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌であっても、同時に保有するカルバペネマーゼの働きによってクラブラン酸による発育阻害が見られない場合があるためである。

図に 3 種類のクラス A  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌に対するディスク法の例を示した。PCR 法によって、TEM、SHV、CTX-M-1group の保有が確認された肺炎桿菌(図-A)では、CAZ および CTX の中央に置かれた二枚のクラブラン酸ディスクによって阻止円が広がっており、クラス A  $\beta$ -ラクタマーゼの産生が認められる。その一方で、SHV、CTX-M-2group に加えて、カルバペネマーゼである IMP-1 型遺伝子を保有する肺炎桿菌(図-B)の場合は、多少の阻止円拡大が見られるものの、図-A に比べて効果が小さい。TEM、SHV、

CTX-M-1group に加えて KPC 型遺伝子を保有する株 (図-C) に至っては、クラブラン酸の効果は全く見られない。IMP-1 のようなメタロβ-ラクタマーゼに属するカルバペネマーゼであればメルカプト酢酸や EDTA が阻害効果を示し、KPC 型に対してはボロン酸による阻害効果からそれらの存在を確認することができるが、いずれにせよ、

同時に保有している他の機構による耐性の機序を、単一の阻害剤の影響のみで判断することは困難である。複数のβ-ラクタマーゼを同時保有する菌が頻出されている現状では、耐性が確認された後、PCR 法等によって遺伝子の保有を確認することが望ましい。



(A) カルバペネマーゼ以外のESBL(IEM, SHV, CIX M 1group型) 遺伝子のみを保有する肺炎桿菌、  
 (B) SHV, CIX M 2group(に加え, IMP 1型(カルバペネマーゼ) 遺伝子を保有する肺炎桿菌、  
 (C) IEM, SHV, CIX M 1group(に加え, KPC型(カルバペネマーゼ) 遺伝子を保有する肺炎桿菌、  
 (D) A Cにおける各ディスクの種類。

図 3 種類のクラス A β-ラクタマーゼ産生菌に対するディスク法の結果

### 3. PCR で検出されなかった場合の薬剤耐性機構の解析方法

複数のβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有していた場合には、阻害剤試験だけでは有効性が限定的であるが、PCR 法での遺伝子検出もまた限定的である。PCR 法は既に報告されているβ-ラクタマーゼ遺伝子を対象に行うものであることから、検出できる遺伝子の種類は限られている。このため、PCR でβ-ラクタマーゼ遺伝子が不検出となった場合には、あらためて阻害剤試験の結果から薬剤耐性機構を推測する必要がある。カルバペネム耐性菌の場合、メタロβ-ラクタマーゼであればメルカプト酢酸などが作用するが、メタロβ-ラクタマーゼではない場合にはクラス D に属する OXA 型カルバペネマーゼ、もしくはクラス A に属するカルバペネマーゼ<sup>2)</sup>が候補として考えられる。クラス A カルバペネマーゼについては、KPC 型の国内における検出例が増えているが、他にも SME 型、IMI 型、NMC-A 型に加え、2014

年に大阪府において多剤耐性緑膿菌から検出された GES 型<sup>3)</sup>なども含まれている。こうした KPC 以外のクラス A カルバペネマーゼも、海外において腸内細菌科細菌からの検出が報告されていることから、注意を向けていく必要がある。

また、本来はカルバペネム系抗菌薬に対する耐性は低いものの、クラス C β-ラクタマーゼに分類される AmpC 型酵素の過剰産生によってもカルバペネム耐性となる場合がある。また、前述した細胞壁通過性の低下や、排出ポンプの増強などによっても耐性菌となることがあるため、PCR 法と阻害剤試験の結果の両面から判断していくことが重要である。

多剤耐性菌の薬剤耐性化機構がますます複雑化している今日においては、検査方法の継続的な改良と開発、および分子疫学的調査が重要と考えられる。当センターにおいても、他部署や他機関等との連携のもと、検査体制を強化していく必要がある。

## 参考文献

1)厚生労働省結核感染症課，感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第12条第1項及び第14条第2項に基づく届出の基準等について（一部改正），平成26年9月，健感発0909第2号.

2) Walther-Rasmussen J et al., Class A carbapenemases,2007,J.Antimicrob. Chemother..

3)金山敦宏ら，高槻市保健所管内X病院における多剤耐性緑膿菌分離症例の集積について，平成26年9月，IASR.

(臨床細菌・動物由来感染症研究室 久保田 寛顕)

表1 検査機関別検査件数及び病原菌検出状況

2015年3月分

検査機関名	検査件数	病原菌検出状況													
		コレラ菌		赤痢菌					チフス菌	パラチフスA菌	その他のサルモネラ	腸管出血性大腸菌	その他*	合計	
		O1, O139	O1, O139以外	A	B	C	D	計							
千代田区千代田保健所	324														
中央区保健所	1012											1	1		2
港区みなと保健所	106														
新宿区保健所	52														
文京区保健所保健サービスセンター 本郷支所	5														
台東区台東保健所	6														
墨田区保健所	1374											1			1
江東区深川南部保健相談所	168														
品川区保健所検査室	100														
目黒区碑文谷保健センター	1788														
大田区保健所	0														
世田谷区世田谷保健所	105														
渋谷区保健所															
中野区保健所	2													2	2
杉並区衛生試験所	1285											4		1	5
豊島区池袋保健所															
北区保健所	1561											2			2
荒川区保健所	150														
板橋区保健所	0														
練馬区保健所	5073											4		17	21
足立区衛生試験所	810														
葛飾区保健所	0														
江戸川区保健所	3657													6	6
小計	17578											12		26	39
島しょ保健所大島出張所	127														
島しょ保健所三宅出張所	83														
島しょ保健所八丈出張所	112														
島しょ保健所小笠原出張所	46														
小計	368														
健康安全研究センター	1151 (9)						2	2				6	1	15	24
小計	1151 (9)						2	2				6	1	15	24
合計	19097 (9)						2	2				18	1	41	63

( ) : 海外旅行者分再掲

\* : 表2参照

表2 病原微生物検出状況(全国及び東京都)

菌 種 名	全国 (2015年2月分)		東京都 (2015年3月分)		
	地研・保健所		健康安全 研究センター	島しょ・区 検査機関	民間登録 衛生検査所
大腸菌	45		1	1	599
毒素原性					
組織侵入性					
病原血清型	3				
腸管出血性	35		1	1	1
その他・不明	7				598
赤痢菌		(2)	2		1
A群					
B群		(1)			
C群					
D群		(1)	2		1
その他・不明					
チフス菌		(1)			
パラチフスA菌		(4)			
その他のサルモネラ	11		6	12	23
O4	5		2	6	10
O7	3		4	2	3
O8	3			2	3
O9				2	6
その他					
不明					1
エルシニア・エンテロコリチカ	2				2
エルシニア・シュードツベルクローシス					
コレラ菌(O1)					
コレラ菌(O139)					
コレラ菌(O1, O139以外)					
腸炎ビブリオ					1
その他のビブリオ					
エロモナス					47
プレジオモナス・シグロイデス		(2)			12
カンピロバクター	33	(1)	15		240
黄色ブドウ球菌	5			2	190
A型ウエルシュ菌					54
ボツリヌス菌					
リステリア・モノサイトゲネス					
セレウス菌					
淋菌					54
クラミジア・トラコマチス					
髄膜炎菌					6
レンサ球菌(A群)	57				453
レンサ球菌(B群)					2377
レンサ球菌(CまたはG群)					
レンサ球菌(その他)					570
肺炎球菌	5				1405
ジフテリア菌					1
百日咳菌	5				
インフルエンザ菌	3				
レジオネラ	5			18	3
肺炎桿菌					
結核菌					
非結核性抗酸菌					
マイコプラズマ					
レプトスピラ					
赤痢アメーバ					2
マラリア					
その他	1			6	
合計	172	(10)	24	39	6040

( ) : 海外旅行者分のうち、全国は別掲、東京都は再掲

全国の数字は「病原微生物検出情報」(国立感染症研究所)より引用  
民間登録衛生検査所の集計値は、LSIメディエンス株式会社の協力による

表3 性感染症検査成績

2015年3月分

東京都健康安全研究センター

区 分	梅毒検査		クラミジア検査				淋菌遺伝子検査	
			抗体検査		遺伝子検査			
	検査数	陽性	検査数	陽性	検査数	陽性	検査数	陽性
保健所*	208	2	94	16	114	7	93	0
累計(2015年1月～)	590	7	230	48	352	20	240	1

保健所\* : 当センターで検査した区または都保健所検体の合計

梅毒検査\*\* : TPLA法とRPR法にてスクリーニングを行い、TPHA法・TPLA法中和試験にて特異性を確認した。

区及び島しょ保健所

	梅毒血清反応			クラミジア抗体				
	検査件数	STS法 陽性	TP抗原法 陽性	検査件数	陽性件数	内訳		
						IgA 抗体陽性	IgA/IgG 抗体陽性	IgG 抗体陽性
男	75	0	0	78	22	6	6	9
女	31	0	0	34	9	1	2	4

表4 都内性感染症病原体定点医療機関から送付された検体の細菌検査成績

2015年3月分

東京都健康安全研究センター

検査項目		検査数	検出数	検査材料	臨床診断名	
クラミジア	トラコマチス	遺伝子	32	8	陰部尿道頸管擦過物/ 分泌物、尿	尿道炎、膻炎・頸管炎・淋菌感染 症、性器クラミジア症、ヘルペス感 染症
ナイセリア	淋菌	遺伝子	32	4	陰部尿道頸管擦過物/ 分泌物、尿	尿道炎、膻炎・頸管炎・淋菌感染 症、性器クラミジア症、ヘルペス感 染症 淋菌性尿道炎
		培養	32	1	陰部尿道頸管擦過物/ 分泌物、尿	

表5 HIV検査数および陽性数

2015年3月分

東京都健康安全研究センター

区 分	男性		女性		性別不明		合計	
	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数	検査数	陽性数
東京都南新宿検査・相談室	559	12	217	0	0	0	776	12
特別区保健所	189	2	102	0	0	0	291	2
確認検査依頼	2	1	0	0	0	0	2	1
合計(2015年 3月分)	750	15	319	0	0	0	1069	15
累計(2015年 1月～)	2185	31	916	1	1	0	3102	32

区及び島しょ保健所

	男	女	不明
検査者数	243	90	1
陽性者数	5	0	0

表6 東京都におけるヒト由来ウイルス検出状況

2015年3月分

東京都健康安全研究センター

ウイルス/型	検出数	検査材料	臨床診断名
インフルエンザ	AH1pdm09型	1	鼻汁、咽頭拭い液
	AH3亜型	13	鼻汁、咽頭拭い液
	B型	16	鼻汁、咽頭拭い液
アデノ	1型	2	咽頭拭い液
	2型	1	糞便
	3型	1	咽頭拭い液
	5型	1	咽頭拭い液
	型別不明	20	咽頭拭い液、結膜拭い液、鼻汁
コクサッキー	A群9型	1	鼻汁
	A群16型	2	咽頭拭い液
エンテロ	型別不明	1	髄液
ライノ		12	咽頭拭い液、鼻汁
単純ヘルペス	1型	2	咽頭拭い液、陰部尿道頭管擦過物/分泌物
	2型	5	陰部尿道頭管擦過物/分泌物/皮膚病巣
EB		3	咽頭拭い液
ヒトヘルペス	6型	4	咽頭拭い液
	7型	4	咽頭拭い液
水痘帯状疱疹		1	咽頭拭い液
ムンプス		5	咽頭拭い液、髄液
ヒトメタニューモ		7	咽頭拭い液、鼻汁
RS		2	咽頭拭い液
ヒトパルボ	B19	5	咽頭拭い液
デング	1型	1	血液
ノロ	G1型	4	直腸拭い液、糞便
	G2型	1	直腸拭い液
サポ		1	直腸拭い液
ロタ		4	直腸拭い液
ヒトパピローマ	6型	3	陰部尿道頭管擦過物/分泌物/コンジローマ患部生検
	11型	2	陰部尿道頭管擦過物/分泌物
	90型	1	陰部尿道頭管擦過物/分泌物

表7 東京都におけるウイルス性胃腸炎・食中毒疑い検査成績

2015年3月分

東京都健康安全研究センター

区分	検体数	検出病原体	陽性数
ふん便・吐物	723	ノロウイルス (G I)	66
		ノロウイルス (G II)	257
		ノロウイルス (G I, G II)	6
		ロタウイルス	0
		サポウイルス	0
食品・拭き取り	243	ノロウイルス (G I)	1
		ノロウイルス (G II)	5
		ノロウイルス (G I, G II)	1
合計	966	陽性数合計	336

表8 ヒト由来抗酸菌検出状況

区及び島しょ保健所

	管理健診	家族健診	接触者健診	その他	計
検査件数	4	0	0	36	40
陽性件数	0	0	0	1	1
結核菌	0	0	0	0	0
非結核性抗酸菌	0	0	0	0	0

◆東京都微生物検査情報◆

2015年 7 月 30日

編集・発行

東京都健康安全研究センター

〒169-0073

東京都新宿区百人町3-24-1

TEL:03-3363-3213

FAX:03-5332-7365

S0000786@section.metro.tokyo.jp

<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/>