

β-ラクタム薬耐性菌とその検出法

Resistant Bacteria Against β-lactam Antibiotics.

—話題の基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生菌およびメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌について—

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 臨床化学研究室 中野 倫太

TOMOTA NAKANO

Clinical Chemistry Department Isehara Research Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

関東化学株式会社 試薬事業本部 ライフサイエンス部 マイクロバイオ部 久保 亮一

RYOICHI KUBO

Life Science Department Reagent, Division, Kanto Chemical Co., Inc.

1. はじめに

細菌感染症の治療には種々の抗菌薬が用いられているが、近年になり、各種抗菌薬に対して耐性を獲得した病原菌が出現し、21世紀の医療において大きな問題となっている。このような薬剤耐性をもつ菌の出現を監視していくことは、細菌感染症患者に適切な治療を施す上で必要不可欠であるばかりでなく、薬剤耐性菌の蔓延や新たな薬剤耐性菌の出現を防止する上で極めて重要である。

最近、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (Extended-Spectrum β-Lactamase, ESBL) 産生菌やメタロ-β-ラクタマーゼ (Metallo-β-Lactamase, MBL) 産生菌といったβ-ラクタム薬に高度耐性を示す菌の蔓延が懸念されている。本稿ではこれらβ-ラクタム薬耐性菌の性状、並びに、ごく最近開発されたESBL、MBL同定検出試薬について概説する。

2. β-ラクタム薬とβ-ラクタマーゼ産生菌

現在、細菌感染症治療に使用されている抗菌薬としては、β-ラクタム薬、マクロライド薬、テトラサイクリン薬、アミノグリコシド薬、キノロン薬などがある。これら抗菌薬の中でβ-ラクタム薬は副作用が少なく細菌に対して選択毒性が高いことから、感染症治療に汎用されている。その一方、細菌の中にはβ-ラクタム薬の基本骨格であるβ-ラクタム環を加水分解し、抗菌力を失わせる酵素(β-ラクタマーゼ)を産生するものが存在している(表1)¹⁻³⁾。このβ-ラクタマーゼに対抗すべく、β-ラクタム薬は様々な改良がなされ、

これまでにペニシリン系薬に加えて、セフェム系薬、カルバペネム系薬、モノバクタム系薬などが開発されてきた。特に、1980年代に登場した第3世代セフェム薬とカルバペネム薬は従来型のβ-ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ、セファロスポリナーゼ、オキサシリナーゼ)に対して安定であるといった特性を有していることから、細菌感染症を起こした入院患者などの治療に幅広く使用されている。

表1 β-ラクタマーゼの分類

| 分類 | 通称 | 加水分解される薬剤 | おもな菌種 |
|----|---------------------|-----------------------|--|
| A | ペニシリナーゼ (PCase) | ペニシリン系 | <i>E.coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> |
| B | メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) | カルバペネム系を含む多くのβ-ラクタム系薬 | <i>P.aeruginosa</i> <i>Serratia</i> <i>S.maltophilia</i> |
| C | セファロスポリナーゼ (CEPase) | セフェム系 | <i>P.aeruginosa</i> <i>E.coli</i> <i>Serratia</i> |
| D | オキサシリナーゼ (OXA) | Cloxacillinを含むペニシリン系 | <i>E.coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>P.aeruginosa</i> |

3. ESBLおよびMBLとその産生菌

ESBLは、従来型のβ-ラクタマーゼには安定であった第3世代セフェム薬やモノバクタムを含む広い範囲のβ-ラクタム薬を分解する酵素である。その遺伝子はペニシリナーゼやオキサシリナーゼ遺伝子が突然変異したものとされている。ESBL産生菌は1980年頃、ヨーロッパ、米国で相次いで発見され、日本国内で最初に存在が確認されたのは1995年である⁴⁾。ESBLは肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大腸菌(*Escherichia coli*)から検出される場合が多く、報告事例は年々増加している。

MBLは活性中心に亜鉛を有していることからこの名が付されている。この酵素は第3世代セフェム薬に加え、 β -ラクタム薬の中で切り札的な存在であるカルバペネム系抗菌薬をも分解するといった憂慮すべき性質を示す酵素である。本酵素の産生菌としては*Bacillus cereus*や*Stenotrophomonas maltophilia*などが報告されていたが^{5,6)}、1990年代に至り、新たにMBL産生能を獲得した緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)やセラチア(*Serratia marcescens*)が日本各地の施設から報告されている^{7,8)}。

これらのESBLおよびMBL産生菌は弱毒菌であるが、高度医療が発達した現代では免疫機能が低下した患者の増加により、それらの感染症は増加している。また、一旦それらの感染症が発症すれば容易に難治性に陥り、時には致死性の感染症を起こすことがある。一般的に感染症の治療には β -ラクタム薬が使用されるため、ESBLまたはMBL産生菌であるか否かの確認は、治療する抗菌薬を選択する上で極めて重要になっている。さらに、ESBLおよびMBL産生菌は院内感染の起因菌になりえることから、これら β -ラクタマーゼ産生菌対策は急務となっている。

4. ESBLおよびMBL産生菌の検査法

従来のESBL産生菌とMBL産生菌の検査方法を表2に示す⁹⁻¹²⁾。ESBL産生菌およびMBL産生菌の検査は、微量液体希釈法やディスク拡散法などが用いられているが、菌を培養するため検査時間が長いといった問題がある。またPCR法や等電点電気泳動は専門の高度な技術が必要である上、検査コストが高いといった問題がある。いずれの方法も一般の検査室等で実施するには難しい面があり、より簡便且つ迅速な検査法の確立が求められている。

表2 ESBLおよびMBLの検査法

| | ESBL | MBL |
|-----|--------------------------------|--------------------|
| 培養法 | 微量液体希釈法 ディスク拡散法 ダブルディスク法 | 微量液体希釈法 ディスク拡散法 |
| その他 | PCR法 等電点電気泳動 | PCR法 |

ごく最近、北里研究所の花木秀明先生らは、ESBLおよびMBLと特異的に反応して変色する新規化合物

HMRZ-86を開発し、この化合物を用いたESBLおよびMBL産生菌の検出方法を構築した¹³⁾。この方法ではMBL活性を阻害するキレート剤を併用することで、ESBL産生菌とMBL産生菌の鑑別を可能にしている。そこで当社は、花木先生らと共同で、HMRZ-86を用いたESBL産生菌とMBL産生菌検出試薬の実用化に取り組み、図1に示すような試験紙タイプの検査試薬を開発した。

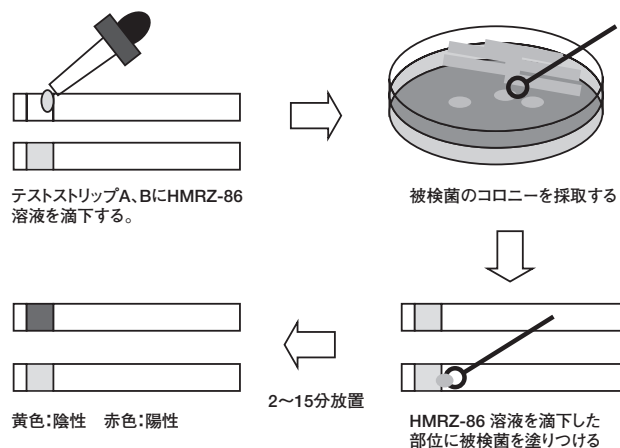


図1 試験方法

本試薬の測定手順は、HMRZ-86溶液をテストストリップに滴下し、分離培養した試験菌を塗抹し、色調の変化を確認するという簡便なものであり、判定までの時間は2~15分と非常に短時間である。MBL阻害剤添加の有無による2種類のテストストリップの反応性からESBLおよびMBLを鑑別する(表3)。

表3 本試薬による β -ラクタマーゼの型分類

| テストストリップA | テストストリップB | 該当する β -ラクタマーゼ |
|-----------|-----------|-----------------------------------|
| 陰性 | 陰性 | セファロスポリナーゼ ペニシリナーゼ オキサシリナーゼ |
| 陽性 | 陰性 | メタロ- β -ラクタマーゼ |
| 陽性 | 陽性 | ESBL |

実際に試験したテストストリップを図2に示す。陽性は赤色、陰性は黄色とコントラストが明瞭で、容易に目視で判別することができた。本試薬を用い、産生する β -ラクタマーゼの種類が明らかになっているATCC標準株や臨床分離株などの30株について試験した結果を表4に示す。ESBL産生菌とMBL産生菌、またはそれ以外の β -ラクタマーゼ産生菌を正しく同定できることが確認され、本試薬を用いることにより、ESBLおよびMBL産生菌を同定、検出できることが示唆された。



図2 CEPAse、MBL、ESBLと2種類のテストストリップとの反応性

表4 各種β-ラクタマーゼ産生菌の試験成績

| β-ラクタマーゼの種類 | 供試検体数 | 陽性検体数 | |
|--------------|-------|-----------|-----------|
| | | テストストリップA | テストストリップB |
| セファロスポリナーゼ | 7 | 0 | 0 |
| ペニシリナーゼ | 5 | 0 | 0 |
| オキサシリナーゼ | 4 | 0 | 0 |
| メタロ-β-ラクタマーゼ | 4 | 4 | 0 |
| ESBL | 10 | 10 | 10 |

5. まとめ

今日、ESBLおよびMBL産生菌は世界的に広がりを見せており、迅速、正確且つ簡便な検査法が必要になっている。上述のHMRZ-86を用いたESBLおよびMBLの検出試薬は、特別な器具を必要とせず、簡便且つ迅速な検出が可能である。本検査試薬は、殊にESBLおよびMBLのスクリーニング検査に非常に有用と思われる。なお、本試薬は近日中に発売の予定である。

最後に、試薬の開発にあたり、ご懇篤なるご指導を頂いた北里研究所の花木秀明博士、並びに全薬工業株式会社の山崎宏亮様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Bush K, et al. : A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39 : 1211-1233, 1995.
- Ambler RP : The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Society Lond (Biol)*, 289 : 321-331, 1980
- 石井良和:基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生大腸菌、クレブシエラ、臨床と微生物, 26 : 121-125, 1999
- Ishii Y, et al. : Cloning and sequence of the gene encoding cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39 : 2269-2275, 1995
- Sadath LD, Abdaham EP : Zinc as a cofactor for a cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochem J*, 98 : 11c-13c, 1966
- Saino K, et al. : Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 22 : 564-570, 1982
- Osano E, et al. : Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 39 : 824-829, 1995
- Senda K, et al. : Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*, 40 : 349-353, 1996
- National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; Approved Standard Eighth-edition, M2-A8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 2003
- National Committee for Clinical Laboratory Standards : Methods for Dilution antimicrobial susceptibility Tests for Bacteria That grow Aerobically ; Approved Standard Sixth-edition, M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 2003
- Jarlier V, et al. : Extended broad-spectrum β -Lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in enterobacteriaceae : hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*, 10 : 867-878, 1991
- Arakawa Y, et al. : Convenient test for screening methallo- β -lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*, 38 : 40-43, 2000.
- 久保亮一ら : 新しい発色基質HMRZ-86を用いたESBLsとメタロβ-ラクタマーゼの簡易・迅速検査法. 第52回日本感染症学会東日本地方会 プログラム・講演抄録集, P166, 2003