

薬剤耐性菌の基礎知識 「ESBLおよびカルバペネマーゼ産生菌」

ESBL - and carbapenemase-producing bacteria

広島大学 院内感染症プロジェクト研究センター

鹿山 鎮男、桑原 隆一、繁本 憲文、木場 由美子、久恒 順三、大毛 宏喜、菅井 基行

Shizuo Kayama, Ryuichi Kuwahara, Norifumi Shigemoto, Yumiko Koba, Junzo Hisatsune, Hiroki Ohge, Motoyuki Sugai
Project Research Center for Nosocomial Infectious Diseases, Hiroshima University



キーワード

カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)、ESBL、ステルス型

01 | はじめに

世界的には1980年代からヨーロッパ、続いて米国で基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(Extended Spectrum β-Lactamase: ESBL)産生菌が出現し、増加してきているが、わが国では海外に比べ、近年までESBL産生菌の流行は顕著ではなかった。しかし2000年を過ぎた頃から徐々に増加が見られ、ここ数年はかなり急激な勢いで分離数が増加している。その影に隠れて国内でも密やかにカルバペネムに耐性を示す腸内細菌科細菌が分離され始めている。カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)は世界的に大問題となっており、CLSI M100-S22やEUCASTの基準で感性を示す株が検査の網をくぐり抜けてしまう点が指摘されている。我が国で分離され始めているステルス型CPEも同様な性質を持つ。

本稿ではグラム陰性菌のβ-ラクタム薬耐性について概説し、我が国で見られるESBLおよびカルバペネマーゼ産生菌について述べる。

02 | 腸内細菌科におけるβ-ラクタム薬耐性の機序(概論)

グラム陰性菌には外膜と内膜が存在し、これらに挟まれた部分はペリプラズムと呼ばれる空間を形成する。グラム陰性菌にとって、外膜は自身に抗菌薬が流れ込む際の最初の防御壁となる¹⁾。

外膜には、様々なタンパクから形成されるポーリンと呼ばれるチャンネルが存在し、これによって薬剤が菌体内へ流入する。すなわち、β-ラクタム薬が環境中に存在する場合、β-ラクタム薬は菌体表面のポーリンによって形成された親水性チャンネルによって外膜を通過し、菌体内部に取り込まれる。このようにして菌体内に取り込まれたβ-ラクタム薬はペリプラズム内部においてpenicillin-binding proteins (PBPs)と結合し、ペプチドグリカン合成を阻害することで菌体に殺菌的に作用する。このようなβ-ラクタム薬の作用の一連の流れに基づき、β-ラクタム薬に対する耐性機序は以下のように分類できる(図1)。

- 1) β-ラクタム薬を加水分解することができる酵素がペリプラズム中に分泌される。
 - 2) 外膜に存在するポーリン孔の変化または消失により外膜の浸透性が低下し、β-ラクタム薬の菌体内部への流入量が減少する。
 - 3) 排出ポンプにより、β-ラクタム薬が排出される。
- 上記のうち、1)に関しては今回のメインピックスであるため、後の章で詳しく述べることにする。2)と3)に関しては、薬剤が細菌細胞のいわゆる“隔壁”を往来する際の流入量の低下あるいは排出量の増加によって菌体内部の薬剤濃度を減少させることにより、PBPsへの効果を減弱させることになる。

グラム陰性菌の外膜は疎水性バリアーを形成し、外界からの刺激、例えば重金属や消毒薬などから自分の身を守っている。この外膜には親水性のチャンネルを形成するポーリンと呼ばれるタンパクがあり、必要な栄養素をここから取り込むが、同時に抗菌薬も取り込まれる。ポーリンは基質に対する特異性や、

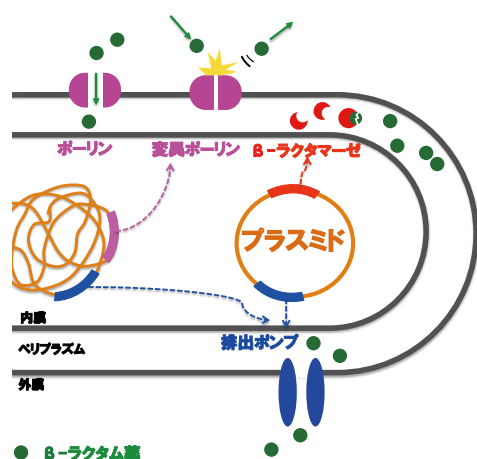


図1.グラム陰性菌のβ-ラクタム薬耐性メカニズム

単量体か三量体かといった構造的な基準などに基づき、いくつかの種類に分類されている¹。ちなみに、大腸菌では3つの主要な三量体ポーリンOmpF、OmpC、PhoEが知られており、これらについてポーリンの先駆的研究がなされ、そこで得られた情報は現在のポーリンに関する知識の基礎となっている。OmpFとOmpCは陽イオンに親和性があり、PhoEは無機リン酸塩と陰イオンに親和性がある¹。腸内細菌科では、薬剤を取り込むのはOmpFかOmpCファミリーに属し、これらに変異が導入されることや発現量の変化によって薬剤感受性が変化する。ちなみに、緑膿菌や*Acinetobacter baumannii*などは生来、β-ラクタム薬が効きにくいことが知られているが、これは低い外膜透過性と関係がある¹。緑膿菌などで認められるこの外膜透過性の低下は、ポーリンの少なさと腸内細菌科細菌のポーリンとの物理化学的な性状の違いから生じている。また、緑膿菌以外の*Citrobacter*、*Enterobacter*、大腸菌や*Klebsiella*などのβ-ラクタム薬感受性は、OmpCまたはOmpFグループに属する非特異的ポーリンの存在が密接に関係する¹。

このようなポーリンの変化による薬剤耐性は、以下の4つに分類される。

ポーリンの構造そのものに変化は無いが、発現量が減る場合。発現量に変化は無いが、チャンネルの基質が制限された場合。発現量に変化は無いが、変異によってポーリンの構造が変化してしまった場合。

ポーリンの構造も発現量も変化が無いが、チャンネル阻害剤が存在する場合。

β-ラクタム薬耐性と薬剤排出ポンプの関与は1990年代に緑膿菌を用いた基礎研究がさかんに行われていたものの、腸内細菌科細菌でより深い臨床的な議論がされるようになったのはつい最近のことである。腸内細菌科細菌の主要な排出ポンプであるAcrAB-TolCに関して、より臨床的な点からの研究が進んでいる。例えば、*K. pneumoniae*もAcrAB-TolCシステムを保有しており、異なるクローン間においてもこのシステムは共通して保有されていることが分かった。Phenylalanyl arginyl β-naphthylamide (PAβN)は排出ポンプの阻害剤としてよく知られており、クロラムフェニコール、ナリジクス酸、オフロキサシン、エリスロマイシンなどのMICを低下させることが過去に大腸菌やサルモネラで示されていた。しかし近年になって、クロキサシリンが*K. pneumoniae*臨床分離株においても排出ポンプの基質となることが示され、他のβ-ラクタム薬、特にセフォキシチン、アモキシシリン、ピペラシリン、セフェ

ピムなどでも同様のことが示された²。

この後の章で、β-ラクタム薬を加水分解することができる酵素、β-ラクタマーゼに関して詳しくみていくことにする。

03 | 広域β-ラクタマーゼ産生菌とそのβ-ラクタマーゼの分類・特徴

世界的には1980年代からヨーロッパ、続いて米国で基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(Extended Spectrum β-Lactamase: ESBL)産生菌が出現し、増加してきているが、わが国では海外に比べ、近年までESBL産生菌の流行は顕著ではなかった(図2)。しかし2000年を過ぎた頃から徐々に増加が見られ、ここ数年はかなり急激な勢いで分離数が増加している。その影に隠れて国内でも密やかにカルバペネムに耐性を示す腸内細菌科細菌が分離され始めている。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(Carbapenem resistant Enterobacteriaceae: CRE)は我が国では感染症法に基づいた感受性基準に基づいて呼称される(表1)。またカルバペネムを含むほとんどすべてのβ-ラクタム薬を分解するカルバペネマーゼを産生する腸内細菌科細菌をCarbapenemase producing Enterobacteriaceae: CPEと呼んでいる。我が国でもCREの判定基準以下のカルバペネムMICを示すCPEが出現しており、それをステルス型CPEと呼んでいる。

i) ESBL産生菌

1960年代後半より基質特異性に基づくβ-ラクタマーゼの分類法がいくつか提案されたが、現在の分類法として最も一般的なものはアミノ酸配列をもとにしたAmblerの分類である。これは、特徴的な配列モチーフをベースとしてA~Dの4種類に分類している。この分類において、クラスAに属する酵素はペニシリン系抗菌薬を、クラスCに属するものはセファロスポリン系抗菌薬を、クラスDに属するものはオキサリシンをそれぞれ効率よく分解する。クラスA、C、Dに属する酵素は活性中心にセリン残基を有しており、セリン型β-ラクタマーゼとして知られている。一方で、クラスBに属する酵素は1分子、あるいは2分子の亜鉛イオンを有することからメタロ-β-ラクタマーゼと名付けられ、カルバペネム系薬剤を含むほぼ全てのβ-ラクタマーゼを分解することが特徴である。

クラスAにおいて、より広い範囲の薬剤に対して分解活性を示すESBLが多く報告されている。ESBLには厳密な意味での定義が存在しない。しかし、一般的に使用されている定義としては、ESBLはペニシリン、第一世代、第二世代、第三世代のセファロスポリン(セフトキシム、セフトリアキソン、セフトジジムなど)、アズトレオナムなどのモノバクタムを加水分解するが、セフォキシチンやセフトetanなどのセファマイシンやカルバペネムを分解せず、クラブラン酸、スルバクタム、タゾバクタムなどに対して阻害されるものをいう。ブッシュラの基質と阻害剤に基づいた機能分類³によると、クラスAのESBLはグループ2beに属する。グループ2beの"e"は、基質特異性が拡張したことを示す。これはさらにセフトジジムを効率よく分解するセフトジジマーゼと、セフトキシムを効率よく分解するセフトキシマーゼに分けることができる⁴。(表1)セフトジジマーゼとしてTEM、SVH、PER、VEB、TLA-1、GES/IBCなどが存在し、セフト

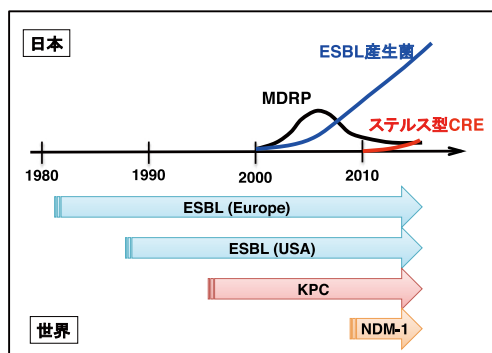


図2. 1980年代以降の世界におけるグラム陰性菌β-ラクタマーゼの潮流と我が国における薬剤耐性菌の出現

タキシマーゼとしてはSFO-1、BES-1、CTX-Mなどが知られている⁴。セフトラジマーゼ型酵素は、アミノ酸変異が生じたことで基質特異性が拡張したタイプであり、このタイプは活性部位のアミノ酸残基の変異が基質特異性に大きく影響していると考えられる⁵。一方で、セフトキシマーゼ型酵素は点変異で生じたタイプとは異なり、基質結合部位の柔軟性が増すことで基質が拡張していると考えられる⁵。

現在、最も世界的に広がっているESBLはCTX-Mである。これらはそもそも、ISEcp1とISCR1という2種類のinsertion sequence (IS) が *Kluyvera* 属の染色体からβ-ラクタマーゼ遺伝子の移動を引き起こしたことに由来するが、これらのISには好みがあり存在し、ISEcp1はほとんどの種類のbla_{CTX-M}を運び一方でISCR1はbla_{CTX-M-2}とbla_{CTX-M-9}を好んで運ぶ。CTX-M familyとnon-ESBL β-ラクタマーゼには相同性の高い部分がいくつか存在するが、Ser237とArg276はCTX-M familyに特異的であり、これらの残基が他のβ-ラクタマーゼに比べてCTX-M familyがセフトキシマーゼを特異的に分解できることを特徴付けているということもつい最近、明らかにされた⁶。

ii) カルバペネマーゼ産生菌

カルバペネマーゼはAmbler分類で3つのクラスに認められ、世界的にみるとその分布に地域特異性がある(表2)。クラスAカルバペネマーゼとしては米国で見出されたKPCが欧米を中心に広がりを見せている。クラスDカルバペネマーゼとしてはOXA-48やOXA-181がギリシャなど欧州を中心に検出されている。これらの酵素は基質認識や触媒反応に重要なアミノ酸残基の位置が従来のクラスAやD型の酵素とわずかに異なることでカルバペネム分解活性を獲得したと考えられる。一方、クラスBカルバペネマーゼはメタロβ-ラクタマーゼ(MBL)で、その幅広い基質特異性からカルバペネムを含むほぼすべてのβ-ラクタム薬を分解できる。我が国ではIMP型が主流で、NDM型は急速に世界的に拡散しており、大きな懸念となっている。

CPEには国内ですでに市中で分離されるものがある一方で、海外からの帰国者とともに輸入される例も散発的に見られる。私どもはカルバペネマーゼをその由来から大きく二つのグループ、内地型と黒船型に分けている(表3)⁷。内地型とは既に国内に分布している株をいう。一方、黒船型は海外からの持ち込みによるものである。近年のメディカル・ツーリズム活発化の

表1.グラム陰性菌β-ラクタマーゼの分類とESBLの位置付け

Bush-Jacoby-Medeiros group	Ambler class	効率よく分解する基質	特徴	阻害		代表的な酵素
				クラブラン酸	EDTA	
1	C	セファロスポリン	グラム陰性菌の染色体上に認められるが、おそらくプラスミド上に存在する。カルバペネムを除く全てのβ-ラクタムを分解できる。	されない	されない	ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 (グラム陰性菌由来AmpC)
2a	A	ペニシリン		される	されない	グラム陽性菌由来ペニシリナーゼ
2b	A	ペニシリン、セファロスポリン		される	されない	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be (ESBL)	A	オキシイミノセファロスポリン、モノバクタム	セフトラジマーゼ型酵素。アミノ酸変異が生じたことで基質特異性が拡張したタイプ。	される	されない	TEM, SHV, PER, VEB, TLA-1, GES/IBC
			セフトキシマーゼ型酵素。点変異で生じたタイプとは異なる。			SFO-1, BES-1, CTX-M
2br	A	ペニシリン	阻害剤耐性のTEMなどが含まれる。	(±)	されない	TEM-30
2c	A	ペニシリン、カルベニシリン		される	されない	PSE-1
2d	D	ペニシリン、クロキサシリン	クロキサシリン(オキサシリン)分解酵素であり、クラブラン酸に少しだけ阻害を受ける。	(±)	されない	OXA-1, OXA-10
2e	A	セファロスポリン		される	されない	<i>Proteus vulgaris</i> 由来誘導型セファロスポリナーゼ
2f	A	ペニシリン、セファロスポリン、カルバペネム	セリン型カルバペネム分解酵素。	される	されない	Sme-1, KPC-2, IMI-1
3	B	カルバペネム系を含むほぼ全てのβ-ラクタム	メタロβ-ラクタマーゼであり、カルバペネムを含むほぼ全てのβ-ラクタムを分解できるが、モノバクタムは分解できない。	されない	される	IMP-1, NDM-1

Bush K et al. 1995. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39:1211-1233.
Shah AA et al. 2004. Res Microbiol 155:409-421.

表2.カルバペネマーゼの分類とその基質

Ambler class	β-lactamase	セフェム				カルバペネム
		ペニシリン	セファロスポリン	セファマイシン	キサセフェム	
		1st	2nd	3rd	4th	
A		■	■			
A	ESBL	■	■			
A	KPC	■	■			
B	MBL	■	■	■	■	
C	AmpC	■	■			
D	OXA	■	■	■	■	

ESBL: Extended spectrum β-lactamase
KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemase
MBL: Metallo β-lactamase
OXA: oxacillinase

表3.我が国で分離された主なカルバペネマーゼ

	種類	Ambler class	ステルス性の有無	産生菌
黒船型	NDM	Class B		<i>E. coli</i>
	IMP-7	Class B		<i>P. aeruginosa</i>
	OXA-48	Class D	ステルス型	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>
	OXA-181	Class D	ステルス型	<i>K. pneumoniae</i>
	KPC	Class A	ステルス型	<i>K. pneumoniae</i>
内地型	IMP-1	Class B	ステルス型	Enterobacteriaceae
	IMP-6	Class B	ステルス型	Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas</i>
	IMP-11	Class B	ステルス型	Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas</i>
	IMP-34	Class B	ステルス型	<i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i>
	IMP-52	Class B	ステルス型	<i>E. coli</i>
	TMB-1	Class B	ステルス型	<i>Acinetobacter</i>
	TMB-2	Class B		<i>Acinetobacter</i>
	SMB-1	Class B		<i>Serratia marcescens</i>
	VIM-2	Class B		<i>P. aeruginosa</i>

影響を受けて、海外で外科治療等を受けた後、帰国後に発症して見つかるケースが増えている。また、カルバペネマーゼを産生するにも関わらず、薬剤感受性検査でカルバペネム感性と判定されてしまうCPEをステルス型CPEと呼んでいる。このタイプのCPEは検査の網をくぐり抜ける可能性があるため、院内感染対策上、重要な耐性菌と位置づけている。

① 内地型

IMP-1, IMP-11産生CPE

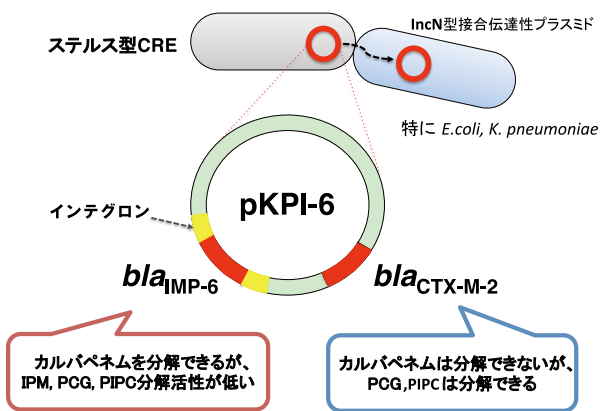
過去の報告ではカルバペネムのMICが高いものが多かったが、中にはMurataniら⁹が報告した*K. pneumoniae*や春日ら⁹が報告した*E. coli*, *Enterobacter*のようにIPMが<1μg/mlないし2μg/mlで、レトロスペクティブに見るとIMP-1産生ステルス型CREも我が国で分離されている。HayakawaらはIMP-1あるいはIMP-11を産生する*E. cloacae*が分離された15症例

について対症例対照研究を報告している。菌株のIPM (67%)、MEPM (80%)のMICが<1 μg/mlであった¹⁰。

IMP-6産生CPE

広島県内で行っているサーベイランスにおいて、IPMには感受性を示すがMEPMには耐性を示す*Klebsiella pneumoniae*が2009年以降、継続的に検出されている¹¹。このような形質を保有する菌の分離は*K. pneumoniae*だけにとどまらず、*E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*など多くの腸内細菌科細菌に相次いで発見されてきた。このような形質をもつ菌をステルス型CPEと名付けた。

このタイプのステルス型CPEが示す特徴的なカルバペネム感受性は、本菌が保有するメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{IMP-6}によるものである¹¹。*bla*_{IMP-6}は、*bla*_{IMP-1}と一塩基異なることで([A640G])アミノ酸の変異が起こり、酵素活性測定(*k*_{cat}/*K*_m)によると、IPM分解活性はMEPM分解活性の7分の1に低下しているという特徴がある¹²。これが、腸内細菌科細菌がステルス型を示す原因となっている。*bla*_{IMP-6}は、伝達性プラスミドであるpKPI-6上のインテグロンに存在している¹³ (図3)。pKPI-6はインテグロンに加え、もう一つの可動性因子上に、ESBL遺伝子である*bla*_{CTX-M-2}を保有している¹³。*bla*_{CTX-M-2}はカルバペネムを分解できないものの、PCG、PIPCの分解は可能である。一方、*bla*_{IMP-6}はMEPMを分解することが可能であるが、IPM、PCG、PIPCの分解活性は大きく低下している。つまり、*bla*_{IMP-6}と*bla*_{CTX-M-2}を同時に保有した菌は、ほぼ全てのβ-ラクタム薬には耐性を示すもののIPMのみに感受性を示すという特殊な表現型を示す(図3、表4)。pKPI-6を保有する株の臨床的な問題点として、カルバペネム系薬の感受性試験をIPM単剤で行った場合はカルバペネム感受性と判断されてしまい、臨床的に治療効果



ほぼすべてのβ-ラクタム薬に耐性だがIPMのみに感受性を示す (IPM 感性 / MEPM 耐性)

図3. *bla*_{IMP-6}保有プラスミドpKPI-6

表4.ステルス型CPEの薬剤感受性 (IMP-6産生株とIMP-34産生株を例に)

	IMP-6産生CRE					IMP-34産生CRE				
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Ampicillin	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Piperacillin	>64	>64	>64	>64	>64	64	32	16	64	16
Cefazolin	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefotiam	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefotaxime	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32
Ceftazidime	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefozopran	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	8	16	8
Cefmetazole	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Cefaclor	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefpodoxime	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4	>4
Flomoxef	32	32	32	32	32	>32	>32	32	32	32
Aztraonam	>16	>16	>16	>16	>16	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Imipenem	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
Meropenem	>8	>8	>8	>8	>8	8	2	2	4	2
Amoxicillin/clavulanate	16	16	16	16	16	>16	>16	>16	>16	>16
Cefoperazone/Sulbactam	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
Piperacillin/Tazobactam						≤16	≤16	≤16	≤16	≤16
Amikacin	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4	≤4
Gentamicin	4	4	4	4	4	4	4	2	2	2
Minocyclin	>8	>8	>8	>8	>8	2	2	4	4	2
Levofloxacin	>4	>4	>4	>4	>4	2	1	1	≤0.5	≤0.5
Fosfomycin	>16	16	16	16	16	>16	16	>16	16	≤4
Sulfamethoxazole/trimethoprim	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	>2	>2	>2

Susceptibility tests were performed using the MicroScan system panel of (μg/mL) antibiotics (Siemens).

* Columns indicate MIC profiles of the donor, the transconjugant and the recipient.

のない抗菌薬を投与してしまう危険性があることが挙げられる^{11,14}。しかも、薬剤感受性を自動で測定する迅速診断装置の一部の機種では、IPMのみならずMEPM耐性の検出もできないということを報告した¹⁵が、現在はカードのアップデートやアルゴリズムの改良などの対策が進んでいる^{16,17}。

IMP-34産生CPE

ステルス型CPEの検討を行っている過程で、IMP-6陰性であるにも関わらずステルス型を示す*K. oxytoca*及び*K. pneumoniae*が見出された¹⁸。これらの株は塩基配列決定の結果、過去に報告がないメタロ-β-ラクタマーゼを保有していることが分かり、IMP-34と名付けた。IMP-34を保有する菌株は、IPM中間耐性と判定されるのが特徴である(表4)。*bla*_{IMP-34}は接合伝達にて大腸菌BL21株への伝達を確認されたことから、プラスミド上に存在することが明らかになった。そこで、*bla*_{IMP-34}保有プラスミドをpKOI-34と名付け、塩基配列決定を行った結果、pKOI-34は87,343 bp(GC 53%, 106 ORF)のIncL/Mプラスミドであることが判明した。pKOI-34は、IncL/Mプラスミドの祖先とされるpEL60類似の骨格に2個の可動性因子を有しており、前者はヒ素耐性遺伝子群、後者は*bla*_{IMP-34}を含んでいた(投稿中)。このIMP-34を保有するインテグロンも接合伝達可能なプラスミド上に存在していることから、拡散する可能性が示唆されている。

② 黒船型

KPC産生CPE

KPCはAmbler分類でclass Aに属するセリン-β-ラクタマーゼ(カルバペネマーゼ)で2001年に米国で*K. pneumoniae*の産生例が報告された。国立感染症研究所の報告によれば我が国では2009年に第1例が報告され、2012年までに6例の報告がある。渡航先としてはインド、中国、北米が挙げられている。我が国での報告例は全て*K. pneumoniae*であるが、世界的には他の腸内細菌科、*P. aeruginosa*、*Acinetobacter*からも分離されている。

NDM産生CPE

NDM産生菌は2009年にインドからスウェーデンに帰国した患者から分離され、その出自からニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ(NDM-1)と命名された。同年に我が国でもインドに旅行した患者から最初のNDM-1産生大腸菌が分離されている(獨協医大株)。NDMは亜型がたくさん見つかって来ているがインド・パキスタン・バングラデシュ地域が流行地で世界中への拡がりも懸念されている。広島県においてもNDM-1産生大腸菌が分離された¹⁹。患者はパキスタンにて外科手術を受け、帰国した後に術後感染症で入院中に本菌が分離された。本菌はFOM以外の検討した全ての抗菌剤について高いMICを示した。NDM産生菌としては国内で7例の報告がある。広島株も獨協医大株もプラスミド上に*bla*_{NDM-1}を保有していた。広島株ではそれ以外に*bla*_{OXA-10}、*bla*_{CMY-6}、アミノグリコシド耐性遺伝子として*rmtC*を保有していた。

表5.2014年改正 感染症法に基づく腸内細菌科細菌のカルバペネム薬耐性基準

検査方法	検査材料
分離・同定による腸内細菌科細菌の検出、かつ、次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認	血液、腹水、胸水、髄液その他の通常無菌的であるべき検体
ア メロペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること イ 次のいずれにも該当することの確認 (ア) イミペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること (イ) セフメタゾールのMIC値が64μg/ml以上であること、又はセフメタゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が12mm以下であること	
次のいずれにも該当することの確認	喀痰、膿、尿その他の通常無菌的ではない検体
ア 分離・同定による腸内細菌科細菌の検出 イ 次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認 (ア) メロペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること (イ) 次のいずれにも該当することの確認 a イミペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること b セフメタゾールのMIC値が64μg/ml以上であること、又はセフメタゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が12mm以下であること	
ウ 分離金が感染症の起原因菌と判定されること	

表6.主なカルバペネム薬感受性基準(CLSI, EUCAST, 感染症法)に基づくIPMの基準と我が国で分離されているIMP-6保有各種腸内細菌科細菌のIPM MIC

MIC	1	2	4	8	16	32
CLSI M100-S22	S	I	R	R	R	R
CLSI M100-S19	S	S	S	I	R	R
EUCAST	S	S	I	R	R	R
SCREEN CUT OFF (EUCAST)						
CRE(5類感染症)		R	R	R	R	R
IMP-6 Kp CRE						
IMP-6 Ko CRE						
IMP-6 Ec CRE						

我が国で出現しているCPEは肺炎桿菌(Kp)、*Klebsiella oxytoca*(Ko)、大腸菌(Ec)他、様々な菌種が見られるが、その多くはIPM MIC<1で現在の基準ではS(感性)と判定され、CREとみなされない。

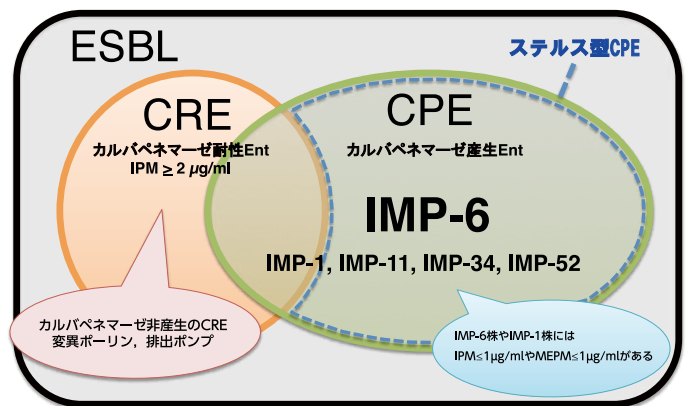


図4.我が国のCRE, CPE, ステルス型CPEの関係性

OXA-48-like産生CPE

2010年、インドのムンバイにて治療を受けた患者が帰国後、入院時に提出されたカテーテル尿から分離された*K. pneumoniae*がIPM感受性MEPM耐性というステルス型薬剤感受性を示した。SMA diskを用いた確認試験において、MBLは陰性であるとの結果であったことから、*bla*_{IMP-6}保有の可能性は否定された。しかし、modified Hodge Test (MHT)は陽性となったことから、MBL以外のカルバペネマーゼ産生が示唆された。次世代シーケンサーMiSeqを用いてドラフト配列を得た結果、*bla*_{OXA-48} familyである*bla*_{OXA-181}や*bla*_{CTX-M-15}を保有していることが判明した²⁰。また、解析の結果、*bla*_{OXA-181}は*K. pneumoniae*の染色体上に存在することが示された。現在までに報告されている*bla*_{OXA-181}はプラスミド上に存在していたが、広島株は染色体上に*bla*_{OXA-181}が存在することが示された初めての症例であった²⁰。また、*bla*_{OXA-181}の上流には、広島株も含めてこれら全ての株に共通して*ISEcp1*が存在することが分かった。塩基配列解析の結果から、反復配列に挟まれた部分が*ISEcp1*によって染色体に組み込まれたと考えられた。

OXA-181は、IPM分解活性のほうがMEPM分解活性よりも約20倍高いことが報告されており、このような酵素活性 (k_{cat}/K_m)のみで考察するならば、OXA-181を保有する株は、むしろ“IPM耐性MEPM感受性(つまり、今回の臨床分離株が示す表現型と逆)”となってしまうと考えられた。そこで、この臨床分離株がIPM感受性MEPM耐性を示すためには、別のメカニズムが存在する可能性が示唆された。解析の結果、この現象の原因は外膜タンパク質の変異であることが明らかになった²⁰。ESBL産生*K. pneumoniae*が保有する外膜タンパク質OmpK35が変異により機能を失い、別の外膜タンパク質OmpK36に、OmpK36Vと呼ばれるフレームシフト変異がある株では、IPM感受性MEPM耐性になることがすでに報告されている。次世代シーケンサーで得た塩基配列解析の結果、私共が解析していた臨床分離株にも同様の変異があることが判明し、この株がIPM感受性MEPM耐性を示すのはOXA-181が原因ではなく、外膜タンパク質の変異のためであることが示された²⁰。

04 | 国内でのCRE、CPE、ステルス型について

2014年9月19日に感染症法施行規則(省令)が改正され、「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症」が、感染症法五類全数把握疾患に指定された。カルバペネムの耐性基準は表5に示す方法に拠る。表6に米国で用いられているCLSI基準、欧州で用いられているEUCAST基準と合わせて現在のイミペネムの判定基準を一覧にした。一方、西日本を中心に分離されているCPEの大部分がIMP-6産生CPEであるが、そのイミペネムMICはほとんどが $<1 \mu\text{g/ml}$ である。このため現行基準ではその多くがS(感性)と判定されCREとみなされない。国内で分離されるCREとCPEの関係を図4に示した。IMP-6産生CPEの中にはメロペネムに対しても $<2 \mu\text{g/ml}$ のものがある。このようにCREとみなされないCPEをステルス型CPEと呼んでいる。我が国におけるCREあるいはCPEの大規模な疫学データはまだない。JANISの五類全数把握に基づく全国調査検査部門2014年年報(CLSI2012版)の結果が待たれるところであるが、私どもが行った西日本地域でのサーベイランスによるとESBL産生*E. coli*の約1.0%、ESBL産生*K. pneumoniae*の約10%がCPEと考えられる。

検査室においてはスクリーニングの段階で如何にCPEを見出すかが最も重要なポイントになる。感受性検査のスクリーニングでは第3世代セファロスポリン系薬剤(CAZ, CMZ)に耐性を示した場合、あるいはIPMとMEPMのいずれかあるいは両方に対するMICが $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の場合はメタロ- β -ラクタマーゼ産生を疑い、メタロ- β -ラクタマーゼの確認検査を行う。薬剤感受性を自動測定する迅速診断装置はカードのアップデートやアルゴリズムの改良を行っていない場合はステルス型CPEのカルバペネム耐性を検出できないケースがある。自病院の検査室自動測定装置の設定条件、性質を知り、ステルス型CPEの基準株を用いてその薬剤感受性パターンを知っておくこと、検出ができるかどうかを確認することが重要である。

ステルス型CPEは見かけ上カルバペネムに感受性を示すが、試験管内においても菌濃度を増やすと明らかに細菌の増殖が観察される(図5)。このためカルバペネムの治療効果が得られない可能性がある。ステルス型CPEは通常のCPEと同じく、基本的には全ての β -ラクタム薬は単剤使用ができないと考えるべきである。

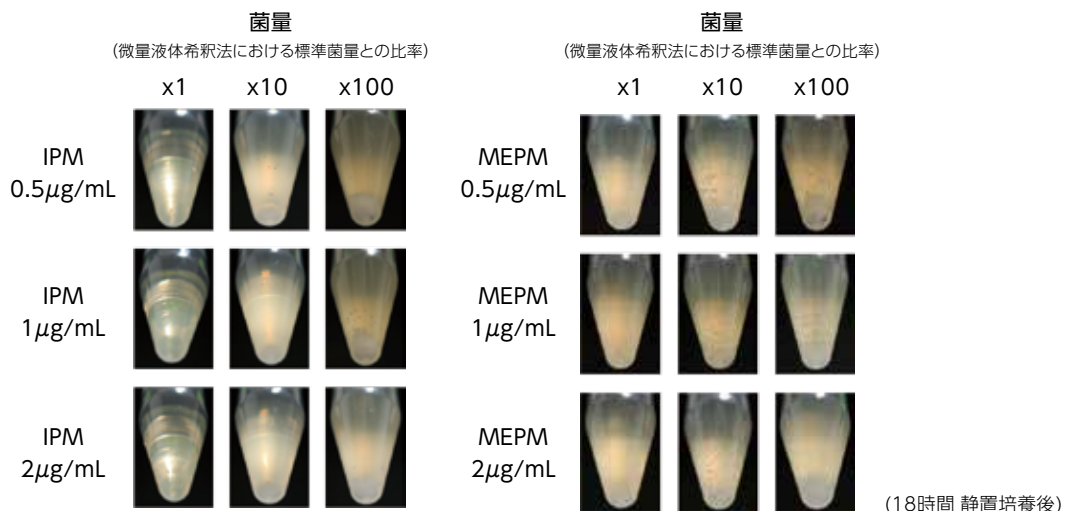


図5.IMP-6保有肺炎桿菌:菌量を増加した菌液にカルバペネムを添加した場合の菌の増殖について

05 | おわりに

2000年以降のESBL産生菌の爆発的増加の陰でステルス型CPEが密かに分離され始めている。またメディカル・ツーリズムが盛んになるに従い、患者の国際的移動に伴う耐性菌の移動の頻度も増してきている。いわゆる黒船型のカルバペネマーゼの国内への伝来である。検査室が驚くような多剤耐性菌は比較的早期に検出され、感染拡大予防策も立てやすいが、ステルス型の場合、その水際での侵入防止対策は難しい。内地型あるいは黒船型ステルスCPEを効率よく検出し、最初に患者が訪れる病院でのdetect and protectをいかに実施するか、我々の知恵が試されている。

参考文献

1. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):593-656. doi:10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
2. Pagès J-M, Lavigne J-P, Leflon-Guibout V, et al. Efflux pump, the masked side of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS ONE.* 2009;4(3):e4817. doi:10.1371/journal.pone.0004817.
3. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1211-1233.
4. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. 2004. doi:10.1128/Antimicrob Agents Chemother 48.1.1-14.2004.
5. 井深章子 酵素反応からみた β -ラクタマーゼの特徴 臨床と微生物 42巻4号P.17-22
6. Adamski CJ, Cardenas AM, Brown NG, et al. Molecular basis for the catalytic specificity of the CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Biochemistry.* 2015;54(2):447-457. doi:10.1021/bi501195g.
7. 鹿山鎮男, 桑原隆一, 繁本憲文, 木場由美子, 大毛宏喜, 菅井基行 わか〓国のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 感染症 第45巻第1号P.30-38
8. Muratani T, Kobayashi T, Matsumoto T. Emergence and prevalence of β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to cepheims in Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(6):491-499. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.03.007.
9. 春日恵理子, 松本竹久, 金井信一郎, 小穴こず枝, 本田孝行, 川上由行: カルバペネム系薬剤に感性を示すIMP-1型Metallo- β -lactamase産生腸内細菌. 感染症誌 2010; 84: 569-574.
10. Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, et al. Molecular and epidemiological characterization of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a large tertiary care hospital in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(6):3441-3450. doi:10.1128/AAC.02652-13.
11. Shigemoto N, Kuwahara R, Kayama S, et al. Emergence in Japan of an imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla_{IMP-6}*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72(1):109-112. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.019.
12. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(5):1343-1348. doi:10.1128/AAC.45.5.1343-1348.2001.
13. Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, et al. Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(2):1356-1359. doi:10.1128/AAC.04759-14.
14. Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, et al. The first case of septicemia caused by imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Lab Med.* 2013;33(5):383. doi:10.3343/alm.2013.33.5.383.
15. Harino T, Kayama S, Kuwahara R, et al. Meropenem resistance in imipenem-susceptible meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates not detected by rapid automated testing systems. *J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2735-2738. doi:10.1128/JCM.02649-12.
16. Koizumi A, Kasahara K, Komatsu Y, et al. Evaluation of the vitek 2 AST-N269 card for detection of meropenem resistance in imipenem-susceptible meropenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3908-3908. doi:10.1128/JCM.02063-13.
17. 櫻山誠也, 奥田立子, 鹿山鎮男 他: Imipenem感受性Meropenem耐性 *Klebsiella pneumoniae* (ISM RK)の検出における改良ライサス迅速法の有効性. 第25回日本臨床微生物学会総会 2014. 演題番号 P-160,315ページ
18. Shigemoto N, Kayama S, Kuwahara R, et al. A novel metallo- β -lactamase, IMP-34, in *Klebsiella* isolates with decreased resistance to imipenem. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(1):119-121. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.030.
19. 鹿山鎮男, 桑原隆一, 繁本憲文 他.: 西日本において初めて分離された *bla_{NDM}*保有大腸菌の性状解析. 第86回日本感染症学会総会・学術講演会 2012. 演題番号 O2-038, 335ページ-b
20. Kayama S, Koba Y, Shigemoto N, et al. Imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-181 in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(2):1379-1380. doi:10.1128/AAC.04330-14.