

薬剤耐性菌検出のために 臨床検査室が実施すべき検査法

The test should be performed in a clinical laboratory
to detect multidrug-resistant bacteria

三重大学医学部附属病院 中央検査部/医療安全・感染管理部 主任臨床検査技師 **中村 明子**
Akiko Nakamura (Chief Medical Technologist)
Mie University Hospital Department of Central Laboratory/Patient Safety and Infection Control

三重県立総合医療センター 中央検査部 主査 臨床検査技師 **海住 博之**
Hiroyuki Kaiju (Chief Medical Technologist)
Mie General Medical Center Department of Central Laboratory



キーワード

ESBL、AmpC型βラクタマーゼ、カルバペネマーゼ

01 | はじめに

βラクタマーゼは、βラクタム系抗菌薬を加水分解する酵素である。本酵素を産生することにより多剤耐性化する腸内細菌科細菌やブドウ糖非発酵菌群などのグラム陰性桿菌が問題視されている。βラクタマーゼには様々な種類があり、基質拡張型βラクタマーゼ(ESBL)、AmpC型βラクタマーゼ(AmpC)、メタロβラクタマーゼ(MBL)がよく知られている。また、日本では少数ながらも、*Klebsiella pneumoniae* caebapenemase (KPC)、ニューデリー型メタロβラクタマーゼ(NDM-1)、OXA型βラクタマーゼの産生株が報告されている。

ESBL、AmpC、MBLをコードする遺伝情報の多くはプラスミド上に存在するため、菌株・菌種を超えて伝達される特性がある。ESBLの場合、米国臨床検査標準委員会(Clinical and Laboratory Standards Institute:CLSI)M100-S25に定められた基準を用いて薬剤感受性を判定する場合、スクリーニング試験および確認試験を実施する必要がないとされている。しかし、院内感染対策の観点からはESBLを検出する意義が高いため、産生が疑われる菌株に対してはスクリーニング試験および確認試験を積極的に実施する必要がある。ESBLとMBLには、CLSIや国立感染症研究所等から提唱された検査法があるが、AmpCの検出については学会発表や論文¹⁾による報告に留まり、現状では明確な判定基準が定められていない。また、複数種類のβラクタマーゼを同時に産生している菌株もあるため、微生物検査を担当する検査技師が各βラクタマーゼの特徴お

よびその検出法等について理解しておく必要がある。

本稿では、代表的なβラクタマーゼであるESBL、AmpC、カルバペネマーゼについて概説する。

02 | ESBL産生菌について

i) 概要

ESBLはAmblerの分類でクラスA βラクタマーゼに属する。クラスA βラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)は本来ペニシリン系抗菌薬を分解する加水分解酵素であるが、クラスA βラクタマーゼをコードする遺伝子の突然変異により、通常分解できない第Ⅲ世代セファロスポリン系抗菌薬なども分解できるようになった酵素をESBLという。

CLSIでは*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*K. oxytoca*、*Proteus mirabilis*の4菌種について判定基準が定められている。しかし、実際にはこれらの菌種以外にも多くの菌種(腸内細菌科細菌科)でESBLの産生が確認されている。

わが国で分離されるESBL産生株の90%以上がCTX-M系である。CTX-M系はセフォタキシム(CTX)、セフトリアキソン(CTRX)、セフェピム(CFPM)には高度耐性を示すが、セフトジジム(CAZ)やアズトレオナム(AZT)には見かけ上感性和判定される場合がある。一方、TEM系やSHV系の遺伝子型のESBLの多くは、CAZやAZTに高度耐性を示し、CTX、CTRX、CFPM等に見かけ上感性和判定される場合が多い(表1)。

ESBLはその酵素活性がクラブラン酸(CVA)やスルバクタム

表1.ESBLの薬剤感受性パターン

βラクタマーゼ	Amblerの分類	遺伝子の所在	菌種	抗菌薬の耐性化												
				ABPC	AMPC/CVA	ABPC/ SBT	PIPC	CEZ	CMZ	FMOX	CTX	CAZ	CFPM	AZT	MEPM	IPM
ペニシリナーゼ	A	プラスミド	すべての腸内細菌科細菌	R	S	S	R	v	S	S	S	S	S	S	S	S
ESBL(TEM・SHV型)			R	S	S	R	R	S	S	v	R	v	R	S	S	
ESBL(CTX型)			R	S	S	R	R	S	S	R	v	R	v	S	S	

S: 通常はSを示す R: 通常はRを示す v: 産生量依存性にS・I・Rと様々な表現系を示す

(SBT)、タゾバクタム (TAZ) により阻害される (表2)²⁾³⁾⁴⁾。臨床検査室での本酵素の検出には、この性質を利用する試験が多い。

ii) スクリーニング

① CLSIによる基準

CLSI (M100-S25) に定められているESBL産生株のスクリーニング基準を表3に示す。前述のとおり、本基準の適用は *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* の染色体上にAmpCをコードする遺伝子を保有しない4菌種のみ限定されている。しかし、AmpCをコードする遺伝子を保有する腸内細菌科細菌科の菌種であっても、同時にESBLを産生する場合もあるため、上記4菌種以外に対するスクリーニングも必要である。

② その他の方法

抗菌薬を含有したスクリーニング培地が各社から市販されている。酵素基質培地を用いている製品 (図1) もあり、その有用性が報告されている。

iii) 確認試験

① 微量液体希釈法

CLSI (M100-S25) に定められている微量液体希釈法によるESBLの検出基準を表3に示す。本法は自動機器にも広く搭載されており、検出感度・特異度に優れ、信頼性の高い検

査法である。用手法試薬としては、E-testの阻害試験用ストリップ (シスメックス・ビオメリュール) が挙げられる。

② ディスク法による阻害試験

CLSI (M100-S25) に定められたディスク法によるESBLの検出基準を表3に示す。本法はディスク拡散法による薬剤感受性試験用のディスクを使用するため、自動機器や耐性菌パネル未導入の施設でも実施しやすい。CVAの添加により阻止円径が5mm以上拡大した場合にESBL産生株と判定する。実際のディスク配置例⁵⁾と判定例を図2に示す。また、ディスクが予めセットされている試薬としてはAmpC/ESBL鑑別ディスク (関東化学) が挙げられる。

③ その他の方法

阻害試験等のための培養を要しない検査法として、シカベータ (関東化学) が挙げられる。結果パターンによる判定を表4に示す。

03 | AmpC産生菌について

i) 概要

AmpCは、クラスC βラクタマーゼ、セファロスポリナーゼともよばれ、セファロスポリン系抗菌薬を加水分解する酵素である。腸内細菌科細菌科のうち、*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii* などの菌種や、ブドウ糖非発酵の

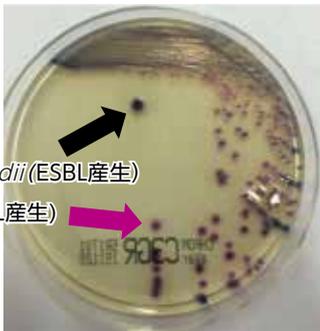


図1. 抗菌薬を含有する酵素基質培地の例 (C3GR培地 関東化学)

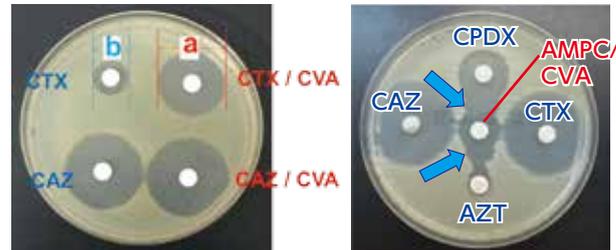


図2. ディスク法によるESBL確認試験
阻止円径 a - b ≥ 5mm であり、CVAによる阻害試験陽性であるため、ESBL産生株と判定。
クラバン酸の阻害により阻止円の拡張を認めるため、ESBL産生株と判定。

表2. 各種βラクタマーゼの阻害剤への反応パターン

βラクタマーゼ名	SBT	CVA	MCIPC	BA	SMA	EDTA
ESBL	+	+	-	-	-	-
AmpC	-	-	+	+	-	-
ESBLとAmpCの複合産生	+(a)	+(a)	+(b)	+(b)	-	-
MBL	-	-	-	-	+	+
KPC	-	-	-	+	-	-
OXA	-	±	-	-	-	-
MBLとESBLの複合産生	+(c)	+(c)	-	-	+(d)	+(d)

(a) AmpCの阻害剤 (BAやMIPIC) の存在条件下のみで阻害試験が陽性化することがある
(b) ESBLの阻害剤 (CVA) の存在条件下のみで阻害試験が陽性化することがある
(c) MBLの阻害剤 (SMAやEDTA) の存在条件下のみで阻害試験が陽性化することがある
(d) ESBLの阻害剤 (CVA) の存在条件下のみで阻害試験が陽性化することがある

表4. シカベータによるβラクタマーゼ産生能の確認

	シカベータI	シカベータCVA	シカベータC	シカベータMBL
ESBL	-	+	-	-
AmpC	-	-	+	-
MBL	-	-	-	+

- ; 赤変
+ ; 黄色もしくはシカベータ I の赤変に比べ弱い

表3. CLSI M100-S25によるESBLの判定基準

スクリーニング基準	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>		<i>P. mirabilis</i>
	ディスク拡散法	阻止円径が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム (CPDX) ≤ 17mm ・セフトラジジム (CAZ) ≤ 22mm ・アズトレオナム (AZT) ≤ 27mm ・セフトラキシン (CTX) ≤ 27mm ・セフトリアキソン (CTRX) ≤ 25mm	阻止円径が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム (CPDX) ≤ 22mm ・セフトラジジム (CAZ) ≤ 22mm ・セフトラキシン (CTX) ≤ 27mm
微量液体希釈法	MIC値 (μg/mL) が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム (CPDX) ≥ 8μg/mL ・セフトラジジム (CAZ) ≥ 2μg/mL ・アズトレオナム (AZT) ≥ 2μg/mL ・セフトラジジム (CAZ) ≥ 2μg/mL ・セフトリアキソン (CTRX) ≥ 2μg/mL	MIC値 (μg/mL) が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム (CPDX) ≥ 2μg/mL ・セフトラジジム (CAZ) ≥ 2μg/mL ・セフトラジジム (CAZ) ≥ 2μg/mL	

確認試験	ディスク拡散法
	以下の抗菌薬の単剤と阻害剤 (CVA) 存在下での阻止円径を比較する。いずれかの薬剤で阻害剤存在下での阻止円径が単剤に比べて5mm以上拡大した場合に確認試験陽性と判定する ・CAZ, CAZ/CVA ・CTX, CTX/CVA
微量液体希釈法	以下の抗菌薬の単剤と阻害剤 (CVA) 混合条件下でのMIC値を比較する。いずれかの薬剤で阻害剤混合条件下でのMIC値が単剤に比べて3管 (8倍) 以上低下した場合に確認試験陽性と判定する ・CAZ, CAZ/CVA ・CTX, CTX/CVA

グラム陰性桿菌はAmpCをコードする遺伝子を染色体上に元来保有している(染色体性AmpC)。通常の状態では、AmpCをコードする遺伝子の転写活性が抑制されているため、その産生量は少ない。しかし、抗菌薬に曝露される等の刺激によりこの酵素の調節遺伝子(*ampR*、*ampD*)に変異が起こると本酵素を過剰に産生するようになり、より広範囲のセフェム系抗菌薬やモノバクタム系抗菌薬を分解できるようになる。またこれとは別に、遺伝子変異により基質が拡張したAmpC型βラクタマーゼが知られている。

AmpC産生菌は、第I・II世代セファロスポリン系抗菌薬やセファマイシン系抗菌薬であるセフメタゾール(CMZ)、およびオキサセフェム系抗菌薬であるフロモキシセフ(FMOX)やラタモキシセフ(LMOX)に対し耐性を示す(表5)。

ESBLなどのクラスA型βラクタマーゼに比べAmpCはβラクタマーゼ阻害剤のうちSBT、TAZ、CVAの影響を受けにくく、ポロン酸(BA)、クロキサシリン(MCIPC)によって酵素活性が阻害される(表2)。臨床検査室での本酵素の検出には、この性質を利用する試験が多い。

ii) スクリーニング

前述のとおり、AmpC産生菌は、第I・II世代セファロスポリン系抗菌薬やCMZ、FMOX、LMOXに対し耐性を示すことが知られているものの、CLSIや感染症法等に明確なスクリーニング基準は定められていない。三重県臨床検査技師会では、暫定的に表6に示すスクリーニング基準を定め⁹⁾、県内施設における検査法の標準化・検出感度の統一を図っている。



図3.ディスク法によるAmpC確認試験

表5.AmpCの薬剤感受性パターン

βラクタマーゼ	Amblerの分類	遺伝子の所在	菌種	抗菌薬の耐性化												
				ABPC	AMP C /CVA	ABPC /SBT	PIPC	CEZ	CMZ	FMOX	CTX	CAZ	CFPM	AZT	MEPM	IPM
誘導型AmpC	C	染色体	<i>Providencia spp.</i>	R	R	r	v	R	r	r	v	v	s	R	S	S
<i>M. morgani</i>			R	R	r	v	R	r	r	v	v	s	R	S	S	
<i>C. freundii</i>		R	R	r	v	R	r	r	v	v	s	R	S	S		
構成型AmpC	C	プラスミド	<i>E. coli</i>	R	R	v	S	R	v	v	v	v	S	R	S	S
プラスミド性AmpC			すべての腸内細菌科細菌	R	R	R	v	R	R	R	R	R	S	R	S	S

- S: 通常はSを示す
- R: 通常はRを示す
- r: ほとんどの場合がRであるが、産生量依存性にIやRとなる場合がある
- s: ほとんどの場合がSであるが、産生量依存性にIやRとなる場合がある
- v: 産生量依存性にS・I・Rと様々な表現系を示す

表6.腸内細菌科細菌のAmpCおよびカルバペネマーゼ産生スクリーニング基準(暫定)

AmpC	ディスク拡散法	阻止円径が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム(CPDX) ≤17mm ・セフタジジム(CAZ) ≤22mm ・アズトレオナム(AZT) ≤27mm ・セフォタキシム(CTX) ≤27mm ・セフトリアキソン(CTRX) ≤25mm
		微量液体希釈法
		+ ・セファマイシン系抗菌薬(CMZ)に耐性傾向がある場合 ・オキサセフェム系抗菌薬(FMOX・LMOX)のいずれかに耐性傾向を示す場合
MBL	ディスク拡散法	阻止円径が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム(CPDX) ≤17mm ・セフタジジム(CAZ) ≤22mm ・アズトレオナム(AZT) ≤27mm ・セフォタキシム(CTX) ≤27mm ・セフトリアキソン(CTRX) ≤25mm
	微量液体希釈法	MIC値(μg/mL)が以下のいずれかを満たす場合 ・セフポドキシム(CPDX) ≥8μg/mL ・セフタジジム(CAZ) ≥2μg/mL ・アズトレオナム(AZT) ≥2μg/mL ・セフタジジム(CAZ) ≥2μg/mL ・セフトリアキソン(CTRX) ≥2μg/mL
		+ ・セファマイシン系抗菌薬(CMZ)に耐性傾向がある場合 ・オキサセフェム系抗菌薬(FMOX・LMOX)のいずれかに耐性傾向を示す場合
		+ ・カルバペネム系抗菌薬(IMP/CS、MEPM)のMIC値が上昇・阻止円径が縮小している場合

酸やEDTAによる阻害試験の検出感度が低く、modified Hodge test (MHT)の有用性も確立されていないため、現在のところは遺伝子検査に頼らざるを得ない。

ii) スクリーニング

感染症法上、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の判定基準はあるものの、現時点では腸内細菌科細菌のカルバペネマーゼ産生に関する明確な基準が示されていない。カルバペネマーゼ産生株は必ずしもIPM やMEPMに試験管内で耐性を示すとは限らず、MBL産生株に対するMIC値がIPM・MEPM共に $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ を示す株の報告例⁹⁾もある(表7)。そのためカルバペネム系抗菌薬のみでスクリーニングを行うと、本酵素の産生を見逃す可能性がある。

ブドウ糖非発酵菌では、第3世代セファロスポリン系抗菌薬であるCAZやS/CにもしくはRを示した場合に、カルバペネマーゼ産生の可能性があるため、確認試験を実施する必要がある。

iii) 確認試験

① ホッジ試験変法(modified Hodge test:MHT)

腸内細菌科細菌のカルバペネマーゼ産生能を判別する試験であるホッジ試験変法の実施方法と判定例を図4に示す。本検査法の感度は90%以上とされ、KPCや大部分のMBLは検出できるものの、OXA型やその他の一部のカルバペネマーゼは検出できないため、結果の解釈には注意が必要である。

② ディスク法によるDDST・阻害試験

MBLに対してはメルカプト酢酸ナトリウム(SMA)を用いたDDSTおよび、(エチレンジアミン4酢酸)EDTAを用いた阻害試験が用いられる。腸内細菌科細菌に対してDDSTを実施する場合、SMAと抗菌薬ディスク間の距離を規定の20mmよりも近づけたほうが判定しやすい場合がある(図5)⁵⁾。また、EDTAはMBLに直接作用するのではなく、培地に含まれる亜鉛をキレートして除去することにより、酵素反応に亜鉛を必要とするMBLの活性を間接的に低下させており、厳密な意味では、阻害剤ではない。さらに、EDTAは、亜鉛だけでなく、細菌の生育に不可欠な、他の二価の金属イオンも同様に吸着除去する能力を持つため、EDTAの存在下では、細菌の生育が非特異的に阻害される現象が見られることがある(例えば、*Acinetobacter*属や*E. coli*などでは、発育阻止帯が出現する株がある)ため、結果の判定にあつ

ては注意が必要である⁹⁾。

KPCに対してはBAを用いた阻害試験が実施される。BAはAmpCの阻害剤でもあるため、本試験単独ではなく、他の試験(MHT等)と組み合わせて結果を判定することが必要である。

- ③ 阻害試験等のための培養を要しない検査法として、CarbaNP試験(自家調製試薬)やシカベータが挙げられる。CarbaNP試験は複数種の β ラクタマーゼを産生する菌株に対しても実施可能であり、市販試薬の発売が待たれる。

05 | おわりに

厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)の報告¹⁰⁾によると、近年、わが国でもグラム陰性の多剤耐性菌の検出数が増加し、治療や感染対策に難渋する場面も多く見られるようになった。細菌の耐性獲得と新規抗菌薬および検査法の開発は「いたちごっこ」であり、検査に要する知識も次々と更新されている。我々微生物検査を担当する検査技師は、耐性菌に関する的確な知識と正しい検査技術を会得し、感染制御の基となる正確な検査結果を提供していく必要がある。

参考文献

1. D. L. Maraskolhe, V. S. Deotale, D. K. Mendiratta, P. Narang, *J. Clin. Diagn. Res.* **8**(6), DC05-DC08 (2014).
2. 小栗豊子編, 臨床微生物検査ハンドブック第4版(三輪書店, 東京, 2011).
3. 日本臨床微生物学会, 多剤耐性菌検査の手引き, <http://www.jscm.org/tazaitaisei/54.html> (参照2015-10-5).
4. 中村文子, 近藤成美, 臨床検査ひとくちメモNo.205, モダンメディア **56**(10), 250-256 (2010).
5. 三重県臨床検査精度管理協議会標準化委員会, 三重県臨床検査技師会微生物講習会検査研究班編, 腸内細菌科の β ラクタマーゼ検査法(三重県臨床検査技師会, 三重, 2014).
6. T. Yagi, J. Wachino, H. Kurokawa, S. Suzuki, K. Yamane, Y. Doi, N. Shibata, H. Kato, K. Shibayama, Y. Arakawa, *J. Clin. Microbiol.* **43**(6), 2551-2558 (2005).
7. "Clinical Impact and Laboratory Detection of Newer β -Lactamases," ASM2012 Workshop-01 (ASM, San Francisco, 2012-06-16/19).
8. 若林真衣, 安田和成, 戸松絵梨, 中澤恵子, 中村明子, 田辺正樹, 日本臨床微生物学雑誌 **25**(Suppl.1), P330 (2015).
9. 薬剤耐性菌研究会, 耐性菌Q&A, <http://yakutai.dept.med.gunma-u.ac.jp/society/QandA.html> (参照2015-10-5)
10. 筒井敦子, 鈴木里和, 山根一和, 山岸拓也, 荒川宜親, *IASR*, **32**(1), 3-4 (2011).

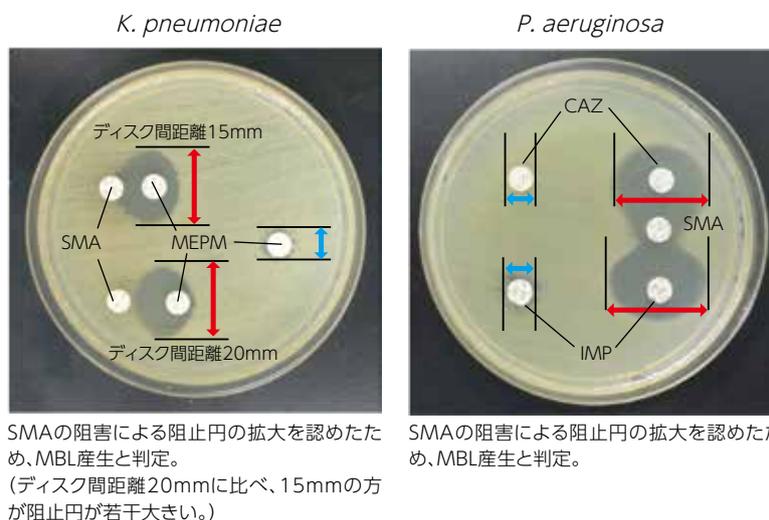


図5.SMAによるDDSTを用いたMBLの確認試験