

[短 報]

臨床分離 *Chryseobacterium indologenes* が保有する
IND-Type β -Lactamase 遺伝子の解析永田美香¹⁾・松本竹久²⁾・松原未樹²⁾・春日恵理子^{1, 2)}
小穴こず枝^{1, 3)}・川上由行^{1, 3)}¹⁾ 信州大学大学院医学系研究科保健学専攻²⁾ 信州大学医学部附属病院臨床検査部³⁾ 信州大学医学部保健学科病因病態検査学講座

(平成 22 年 3 月 31 日受付, 平成 22 年 7 月 12 日受理)

Chryseobacterium indologenes は metallo- β -lactamase (MBL) に分類される IND-type β -lactamase (IND) 遺伝子 (*bla*_{IND}) を染色体上に保有し、カルバペネム系を含む多くの β -lactam 薬に耐性を示す。臨床分離株 13 株と基準菌株について分子疫学解析および *bla*_{IND} 解析を行ったところ、6 パターンに分類された菌株はすべて *bla*_{IND} を保有し、3 パターンの菌株は IND-2, 2 パターンの菌株は IND-2a を保有していた。残り 1 パターンの菌株の保有する MBL はデータベース上において最も高い相同性を示したのが IND-2 (99%, 241aa/243aa) で、100%一致するものではなく、この IND type を IND-15 とした。薬剤感受性は多くの菌株で β -lactam 薬に対し高い MIC 値を示したが、IND-15 を保有する菌株は imipenem や β -lactamase 阻害剤と β -lactam 薬との合剤に低い MIC 値を示した。*C. indologenes* にはカルバペネム系抗菌薬に対し耐性とならない株も存在するため、同定の際に薬剤感受性を確認する場合は注意する必要がある。

Key words: *Chryseobacterium indologenes*, metallo- β -lactamase, IND

Chryseobacterium 属は family *Flavobacteriaceae* に属する偏性好気性ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌で、土壌中や水中など広く環境中に生息する¹⁾。臨床で分離される菌種は *Chryseobacterium indologenes* および *Chryseobacterium gleum* が挙げられ、なかでも黄色色素を産生する *C. indologenes* は、基礎疾患のある入院患者に対し人工呼吸器や留置器具を介した肺炎、敗血症などを引き起こすことが報告されるなど臨床材料からの分離頻度が高い¹⁻³⁾。

Metallo- β -lactamase (MBL) は補因子として亜鉛イオンを要し、カルバペネム系を含む多くの β -lactam 薬を加水分解するため臨床問題となる⁴⁾。*C. indologenes* は MBL である IND-type β -lactamase 遺伝子 (*bla*_{IND}) を染色体上に保有し、現在 1, 2, 2a, 2b, 2c, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 の 17 型が登録されて

いる^{3, 5-8)}。

今回、信州大学医学部附属病院臨床検査部で分離された *C. indologenes* が保有する *bla*_{IND} について遺伝学的に解析し、これまでの既登録 17 型のいずれにも該当しない新規の遺伝子型が見いだされるなど興味ある知見を得たので報告する。

対象菌株は 2006 年 11 月～2009 年 4 月に信州大学医学部附属病院臨床検査部細菌検査室で分離され、16S rRNA 遺伝子配列と MicroScan Neg Combo 6.11J パネル (SIEMENS) の検査結果を合わせて *C. indologenes* と同定された 13 株、および基準菌株 *C. indologenes* ATCC29897^T 1 株を使用した。供試 13 株は、喀痰由来 10 株、経皮経肝胆管ドレナージ由来 1 株、普通糞便由来 1 株、腸瘻由来 1 株である。ただし喀痰 2 株は同一患者由来であった。16S rRNA 遺伝子は QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) により抽出した被検菌株の DNA を、16S rRNA universal primer set (primer 27F: 5'-AGAGTTTGTATCTGGCTC-AG-3', primer 1494R: 5'-TACGGCTACCTTGTTA-CGAC-3') を用いて PCR 法により増幅した⁹⁾。DNA

著者連絡先: (〒390-8621) 長野県松本市旭 3-1-1
信州大学医学部保健学科検査技術科学専攻
病因病態検査学講座
川上由行
E-mail: yk23724@shinshu-u.ac.jp

polymerase には TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いた。さらにこの増幅産物を QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) により精製し, dideoxy terminator 法によりシーケンス反応を行った。シーケンス試薬は BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用し, PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。この塩基配列を Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) により解析し, *C. indologenes* の基準菌株と 98% 以上の相同性を持つ菌株を *C. indologenes* とした。

同一クローンの確認は pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) により行った。制限酵素は *Xho*I (New England Biolabs) を用い, CHEF MAPPER (BIO RAD) により泳動を行った。泳動条件はパルスタイム 0.47~30.82 秒, 電圧 6.0 V/cm, 泳動時間 20 時間 18 分とした。以下の解析は各パターンの代表 1 株について行った。

*bla*_{IND} 検出は PCR 法により行った。Bellais らの報告⁵⁾ に基づき *ex-bla*_{IND} primer set (primer 1: 5'-GGTTTGCATATCTATCTGCC-3', primer 2: 5'-ATCCAAAGAGAGGCTGGAGT-3') と *bla*_{IND} universal primer set (primer 3: 5'-GCCCAGGTTAAAGATTTTGTAAAT-3', primer 4: 5'-CATGGCCACCGCCTTTCATTC-3') を用いて 16S rRNA 遺伝子解析と同様の方法で *bla*_{IND} を含んだ外部領域約 960 bp および内部領域約 580 bp を増幅し, 外部領域の産物を用いて塩基配列を決定した。得られた被検菌株の各 *bla*_{IND} 塩基配列の Open Reading Frame を, 日本 DNA データバンク (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcom-j.html>) の BLAST により相同性検索し, 各々の IND type を解析した。

薬剤感受性は MicroScan Neg Combo 6.11J パネルを用いて MIC を測定した。ESBL 産生確認検査は MicroScan Neg シリーズ Neg MIC3.31E パネル (SIE-MENS) を用いて行った。

16S rRNA 遺伝子配列と MicroScan Neg Combo 6.11J パネルの検査結果を合わせて *C. indologenes* と同定された 13 株, および基準菌株 *C. indologenes* ATCC29897^T 1 株の PFGE による泳動像を図 1 に示す。図 1 から基準菌株を含めた供試 14 菌株は A-1 (8 株), A-2 (1 株), B (2 株), C (1 株), D (1 株), E (1 株: ATCC29897^T) の六つのパターンに分類された。A-2 は A-1 と 1 本のバンドの差であり, Tenover らの分類基準¹⁰⁾ から同一クローン由来とした。

各パターンの 1 株について PCR 法により *bla*_{IND} を

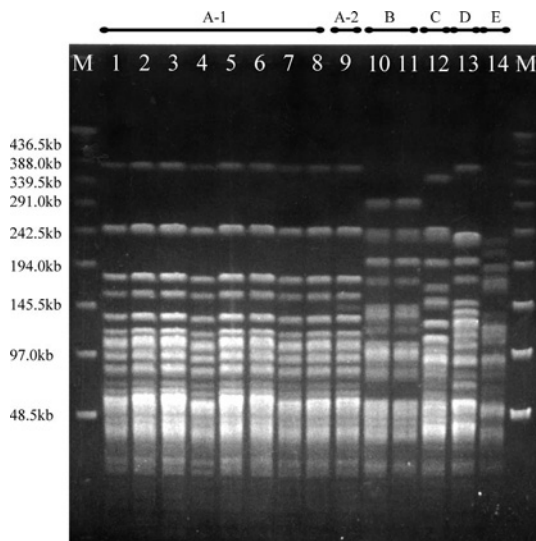


図 1. PFGE 解析結果

Lane 1~13: 臨床分離株, ただし Lane 10, 11 は同一患者由来, Lane 14: ATCC29897^T, M: Lambda Ladders. Lane 1~8, 9, 10~11, 12, 13, 14 はそれぞれ A-1, A-2, B, C, D, E に分類。

検出したところ, すべての菌株で *bla*_{IND} の外部領域および内部領域が検出された (data not shown)。このうち外部領域増幅産物のシーケンスから得られた塩基配列と BLAST によるデータベース検索の結果, パターン A およびパターン B の菌株はそれぞれ IND-2a, IND-2 と 100% 一致した。パターン C の菌株は塩基配列では IND-2 と比較し三つの塩基変異が見られたが, アミノ酸配列では IND-2 と 100% 一致した。パターン D の菌株はデータベース上に 100% 一致するものはなかった。最も相同性の高い type は IND-2 であり, IND-2 に対し W167R と T208M の変異が存在した。この IND type を IND-15 とした (DDBJ / EMBL/GenBank accession number AB563173)。*C. indologenes* ATCC 29897^T の IND type は IND-2 と 100% 一致した。

パターン A-1, A-2, B, C および E の菌株は β -lactam 薬に対し高い MIC 値を示した。一方, パターン D の菌株は他と比較し imipenem (IPM) や class A β -lactamase 阻害剤との合剤である amoxicillin-clavulanic acid (AMPC / CVA), cefoperazon-sulbactam (CPZ/SBT) に低い MIC 値を示した (表 1)。パターン D の菌株について ESBL 産生確認検査を行ったところ, ceftazidime (CAZ) および cefotaxime (CTX) の MIC はそれぞれ >128 μ g/ml, 64 μ g/ml であったのに

表 1. 各 PFGE パターンにおける薬剤感受性

PFGE pattern	IND-type	MIC ($\mu\text{g/ml}$) for:									
		ABPC	PIPC	CAZ	CPDX	CTX	CMZ	IPM	AZT	AMPC/CVA	CPZ/SBT
A-1	IND-2a	>16	>64	>16	>4	>32	16	>8	>16	>16/8	>32/16
A-2	IND-2a	>16	>64	>16	>4	>32	16	>8	>16	>16/8	>32/16
B	IND-2	>16	>64	16	>4	>32	32	>8	>16	>16/8	>32/16
C	IND-2	>16	>64	>16	>4	>32	16	>8	>16	>16/8	>32/16
D	IND-15	>16	64	>16	>4	>32	32	≤ 1	>16	$\leq 8/4$	$\leq 16/8$
E	IND-2	>16	>64	>16	>4	>32	16	>8	>16	>16/8	>32/16

表 2. PFGE パターン A-1 および A-2 の菌株における診療科および病棟*

Lane	材料	分離日	診療科	病棟
1	喀痰	2008. 3.12	A	1
2	喀痰	2008. 7. 4	A	2
3	喀痰	2008. 7.28	B	2
4	喀痰	2008.10.17	A	2
5	喀痰	2007.12.28	A	2
6	喀痰	2008. 1. 8	C	3
7	喀痰	2008. 1.18	A	2
8	普通糞便	2007. 9.26	D	2
9	喀痰	2007. 2.19	A	1

*パターン A-1 および A-2 の菌株はすべて別患者由来。

対し CAZ/CVA および CTX/CVA の MIC はそれぞれ $8/4 \mu\text{g/ml}$, $2/4 \mu\text{g/ml}$ であった。

本解析における PFGE の結果 (図 1) から臨床分離株 13 株のうち 9 株が同一クローンに由来することが判明し, *C. indologenes* による交差感染が示唆された。9 株のうち 8 株は病棟と診療科に関連性を認め (表 2), 環境もしくは接触感染による伝播が推定されたが, Lane 6 の 1 株はそれ以外の要因が考えられた。*C. indologenes* は MBL を保有することから, MRSA や緑膿菌などと同様に抗生剤の投与により選択的に増殖し, 他の患者への感染が生じやすくなったことが伝播の原因と考えられた。*C. indologenes* はいわゆる hospital strain として病院内環境に定着していることも念頭に置いた感染制御活動の対象菌種に位置づけるべきと考える。

本院で分離された *C. indologenes* 5 株および基準菌株 1 株はすべて *bla*_{IND} を保有していた。このうち基準菌株を含む 5 株は MBL を産生し, β -lactam 薬に対し高い MIC 値を示した。一方, パターン D の 1 株は *bla*_{IND} を保有するにもかかわらず IPM に低い MIC 値を示し, かつ class A β -lactamase 阻害剤との合剤である AMPC/CVA, CPZ/SBT に低い MIC 値を示し

た。これらのことからパターン D の菌株の保有する変異型 MBL IND-15 の酵素活性に何らかの変化が生じていることが示唆された。考えられる原因として, アミノ酸変異により MBL の酵素活性が失活し, 他の薬剤耐性機構が表現型として現れている可能性がある。また, ESBL 産生確認検査の結果より class A β -lactamase の存在が示唆された。今後, 二つのアミノ酸変異が IND-2 に及ぼす影響および *C. indologenes* が保有していると考えられる class A β -lactamase について詳細な解析を行う必要がある。

本解析により *C. indologenes* はさまざまな IND-type β -lactamase を保有していることがわかった。しかし, *C. indologenes* の薬剤感受性を確認する際は, カルバペネム系抗菌薬や β -lactamase 阻害剤と β -lactam 薬との合剤に対する MIC 値が低い *C. indologenes* が存在することに注意しなければならない。

文 献

- Schreckenberger, P. C., M. I. Daneshvar, D. G. Hollis. 2006. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods. p. 791–793. In: Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. (P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, et al. eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hsueh, P. R., L. J. Teng, P. C. Yang, et al. 1996. Clinical and microbiological characteristics of *Flavobacterium indologenes* infections associated with indwelling devices. J. Clin. Microbiol. 34: 1908–1913.
- Bellais, S., S. Leotard, L. Poirel, et al. 1999. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. FEMS Microbiol. Lett. 171: 127–132.
- Frère, J. M. 1995. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. Mol. Microbiol. 16: 385–395.

- 5) Bellais, S., L. Poirel, S. Leotard, et al. 2000. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3028–3034.
- 6) Perilli, M., B. Caporale, G. Celenza, et al. 2007. Identification and characterization of a new metallo- β -lactamase, IND-5, from a clinical isolate of *Chryseobacterium indologenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 2988–2990.
- 7) Zeba, B., F. D. Luca, A. Dubus, et al. 2009. IND-6, a highly divergent IND-type metallo- β -lactamase from *Chryseobacterium indologenes* strain 597 isolated in Burkina Faso. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 4320–4326.
- 8) Yamaguchi, Y., N. Takashio, J. Wachino, et al. 2010. Structure of metallo- β -lactamase IND-7 from a *Chryseobacterium indologenes* clinical isolate at 1.65Å resolution. *J. Biochem.* 147: 905–915.
- 9) Neilan, B. A., D. Jacobs, T. D. Dot, et al. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic *Cyanobacteria* of the genus *Microcystis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 693–697.
- 10) Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233–2239.

Molecular Analyses of IND-Type β -Lactamase Genes from Recent Clinical *Chryseobacterium indologenes* Isolates

Mika Nagata¹⁾, Takehisa Matsumoto²⁾, Miki Matsubara²⁾,
Eriko Kasuga^{1, 2)}, Kozue Oana^{1, 3)}, Yoshiyuki Kawakami^{1, 3)}

¹⁾ Division of Infection Control and Microbiological Regulation in Health Sciences, Shinshu University Graduate School of Medicine

²⁾ Department of Laboratory Medicine, Shinshu University Hospital

³⁾ Division of Clinical Microbiology, Department of Biomedical Laboratory Sciences, School of Health Sciences, Shinshu University School of Medicine

Chryseobacterium indologenes is known to demonstrate a decreased susceptibility to most β -lactam agents including carbapenems, due to the production of chromosome-encoded IND-type metallo- β -lactamase (MBL). Molecular and epidemiological analysis of the 13 recent clinical isolates and an ATCC 29897^T, the type strain of *C. indologenes*, disclosed that they were classified into 6 types consisting of 3 IND-2, 2 IND-2a, and 1 uncategorized IND types. The 99% homology (241aa/243aa) of the amino acid sequences was observed between the uncategorized IND and the IND-2 types. However, in the subsequent analysis of the uncategorized IND type, the amino acid substitutions of W167R and T208M were noted in comparison with the IND-2 gene, which we designated as IND-15. Only the strain possessing the IND-15 type gene exhibited susceptible against imipenem and β -lactams with β -lactamase inhibitors. It should be noted that some strains reveal to be sensitive to carbapenems notwithstanding the possession of resistance genes.