

[原 著]

緑膿菌における AAC(6′)-Iae 産生株の検出状況

霜島正浩¹⁾・坂入和宏¹⁾・小川美保¹⁾・秋山 徹²⁾・田中雅士³⁾
 榎原謙次³⁾・切替照雄²⁾・賀来満夫⁴⁾

¹⁾ (株)ビー・エム・エル細菌検査部

²⁾ 国立国際医療研究センター研究所感染症制御研究部

³⁾ (株)ミズホメディー開発部

⁴⁾ 東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座

(平成 23 年 4 月 6 日受付, 平成 23 年 9 月 5 日受理)

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は湿潤環境に存在する常在菌である。しかし近年、複数の薬剤に耐性をもつ多剤耐性緑膿菌 (MDRP multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*) が出現し、医療現場において、危険で重要な起因菌として認識されている。そのため、院内感染防止対策や治療を行うに当たって、早期に、迅速に、検出する必要がある。緑膿菌が獲得する耐性因子の中で、アミノグリコシド系薬剤に対して高度に耐性をもつ因子であると考えられているアミノグリコシド 6′-N-アセチル基転移酵素 AAC(6′)-Iae がある。この耐性因子をイムノクロマト法の原理に基づき、培養コロニーから簡便・迅速に検出できる「AAC(6′)-Iae クロマト」⁷⁾ が開発された。今回この AAC(6′)-Iae クロマトを使用する機会を得たため、全国から収集された緑膿菌の AAC(6′)-Iae 保有率の調査を実施した。2009 年から 2010 年にかけて全国から分離された薬剤耐性の緑膿菌 297 株を対象に AAC(6′)-Iae の検出を行ったところ、これまで報告されていた関東・東北などの医療施設のみならず、九州・沖縄から北海道まで全国的に分散していることが新たに明らかとなった。薬剤感受性試験で MDRP と分類された 254 株においては 152 株 (59.8%) で AAC(6′)-Iae が検出され、単剤または 2 剤に対して耐性をもつ緑膿菌においては 43 株中 6 株 (13.9%) で AAC(6′)-Iae が検出された。一方、薬剤感受性試験で 3 剤共に高度に耐性を示すとされる高度多剤耐性緑膿菌株は 254 株中 34 株 (13.4%) 存在しており、この 34 株のうち 31 株という高頻度 (91.2%) で AAC(6′)-Iae を保有していることがわかった。高度多剤耐性緑膿菌株においては AAC(6′)-Iae の関与を裏づける結果となった。このような薬剤耐性因子の検索は遺伝子検査法が主流であるが、実際に遺伝子検査を実施できる施設は限られている。本方法はこれまで遺伝子検査が不可能であった施設での検査を可能とし、薬剤耐性因子の検査・診断技術を大きく向上させたと言えるだろう。また、従来法に比べ簡便・迅速に検出することができるため、院内染対策上有用であると考えられる。

Key words: 多剤耐性緑膿菌, 高度多剤耐性緑膿菌, MDRP, AAC(6′)-Iae クロマト, AAC(6′)-Iae 抗原, アミノグリコシド耐性

序 文

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は生来多くの抗

菌薬に耐性であり、セフトジウム、イミペネムなどの β-ラクタム系薬剤やアミカシン、トブラマイシンなどのアミノグリコシド系薬剤などのごく限られた薬剤が治療に用いられる。1980 年代初頭には、治療効果が期待されるニューキノロン系薬剤のシプロフロキサシンやレボフロキサシン、広域スペクトラムを有するカルバペネム系薬剤のイミペネムなど、アミノグリコシド系のアミカシンなど、これら 3 系統の抗菌薬すべ

著者連絡先: (〒350-1101) 埼玉県川越市の場 1361-1
 (株)ビー・エム・エル検査本部
 霜島正浩
 TEL: 049-232-0451 (内線 3310)
 FAX: 049-232-0116
 E-mail: masahiro_shimajima@bml.co.jp

てに耐性を示す株が出現し始め、多剤耐性緑膿菌 (MDRP: multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*) と呼ばれるようになった。本邦では、薬剤耐性緑膿菌感染症は5類感染症定点把握疾患に定められており、緑膿菌における最小発育阻止濃度 (MIC) 値は、IPM, AMK, CPFX の3剤に対し、 $16 \mu\text{g/ml}$ 以上、 $32 \mu\text{g/ml}$ 以上、および $4 \mu\text{g/ml}$ 以上で規定されている。

(株)ビー・エム・エル (BML) は広域検査センターとしての役割を担う目的で、2001年10月から新鮮臨床分離株における各種抗菌薬に対する薬剤感受性試験結果を集計し医療機関へ情報のフィードバックサービスを行っている。当社での調査の結果、2007年度の年間MDRP検出率は0.58% (692/120,003)¹⁾であったのに対し、翌年2008年度は3.88% (5,012/129,274)²⁾と急増傾向が認められた。

さらに、近年、MDRPについては、3剤すべてに対して $128 \mu\text{g/ml}$ 以上と高いMIC値を示し、高度に耐性をもつ株が認められ、高度多剤耐性緑膿菌 (高度MDRP) として着目されている。高度MDRPにはアミノグリコシド修飾酵素の一つであるアミノグリコシド6'-N-アセチル基転移酵素 AAC(6')-Iae、およびβ-ラクタム薬剤に耐性をもつ因子であるメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) IMP-1を産生する特徴をもつことが明らかにされている⁴⁾。これらの因子は菌自体の遺伝子DNAとは別に独立して存在する外因性プラスミド上にコードされており、細菌同士の接触のみでこれらの因子の伝播が容易に行われることから、極めて重要な薬剤耐性因子であり、その動向を知る必要があると考えられる。

このAAC(6')-Iaeを産生するMDRP株は、始めに宮城県内でMDRP多発事例として報告され³⁾、その後、宮城県内の多施設⁴⁾、東京の医療施設⁵⁾、関東地方の多施設⁷⁾、広島県の施設⁶⁾、で検出が報告されたことから、関東、東北を中心に広がりをみせていると考えられるが、全国的な調査までは行われていなかった。

これは、一般的な検査室レベルでのMDRPに関する試験は薬剤感受性試験やディスク法がほとんどであり、AAC(6')-Iaeのような薬剤耐性因子の検出になると、遺伝子検査法のみで、実施できる施設に限られているためであった。

今回、国立国際医療研究センター研究所と(株)ミズホメディーとでイムノクロマト法の原理に基づく簡単に迅速かつ特異的にAAC(6')-Iaeを検出できる「AAC(6')-Iaeクロマト」が開発され、われわれはその試薬を使用する機会を得たため、当施設が保有する薬剤耐性を示す緑膿菌臨床分離株を対象にAAC(6')-Iae産生菌株の存在について検討した。

対象と方法

1. 対象菌株

当施設において2009年9月から11月、さらに2010年5月から8月の各期間に臨床分離された緑膿菌についてVITEK 2 (シスメックス(株)) またはWalkAway96 (シーメンス(株)) を用いた薬剤感受性試験結果に基づきそれぞれ103株および194株計297株をMDRPの疑いありと同定し、これらを臨床分離株として調査検討に用いる対象菌株とした。

2. 薬剤感受性試験

微量液体希釈法であるフローズンプレート「栄研」(栄研化学(株)) を使用し、IPM, AMK, CPFXの3剤に対するMIC値がそれぞれ $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, $\geq 32 \mu\text{g/ml}$, $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ 示した緑膿菌をMDRPと判定した。3剤に対するMIC値がすべて $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ を示した緑膿菌を高度MDRPとした。また、3剤いずれかの薬剤に対してMIC値が単剤、もしくは2剤についてMDRP判定基準を満たした緑膿菌を薬剤耐性緑膿菌とした。

3. アミノグリコシド6'-N-アセチル基転移酵素 AAC(6')-Iaeの測定

「AAC(6')-Iaeクロマト」を用い、今回収集した297株の緑膿菌に対しAAC(6')-Iaeの検出を試みた。



図1. AAC(6')-Iae クロマト試薬の判定パターン

操作方法としては培地上の緑膿菌コロニーを、綿棒を用いて採取し、綿球部を抽出容器内の抽出液につけ込み容器内に刻まれた溝を利用して十分に磨砕させ抗原抽出を行う。こうして得られた抗原抽出溶液は付属の滴下用ノズルキャップを装着して、その3滴を AAC(6')-Iae クロマトの試料滴下部に滴下する。結果判定は、試料液を滴下してから15分で行い、判定ライン部にラインが認められれば「陽性」とした(図1)。

結 果

1. 薬剤感受性試験

検討に用いた緑膿菌 297 株中 254 株 (85.5%) が MIC においても MDRP と判定され、43 株 (14.5%) が、MDRP の基準から逸脱した単剤もしくは2剤耐性菌であった。内訳は、IPM 耐性が1株 (0.3%)、CPFX 耐性が3株 (1.0%)、IPM、CPFX 耐性が35株 (11.8%)、AMK、CPFX 耐性が4株 (1.3%) であった。MDRP 254 株の中でも IPM、AMK、CPFX の MIC 値が 128 μg/ml 以上を示した高度 MDRP は 34 株 (11.4%) 存在した。

2. アミノグリコシド 6'-N-アセチル基転移酵素 AAC(6')-Iae 検出

今回調査した緑膿菌 297 株において AAC(6')-Iae イムノクロマトを用いると 158 株 (53.2%) から AAC(6')-Iae が検出された。AAC(6')-Iae が検出された菌株ごとの検出率は、高度 MDRP が 34 株中 31 株 (91.2%)、高度でない MDRP が 220 株中 121 株 (55.0%)、単剤または2剤に耐性がある薬剤耐性緑膿菌 43 株中 6 株 (14.0%) であった。高度 MDRP 株から 91.2% と高率に AAC(6')-Iae が検出された結果となった(表1)。

材料別にみた陽性率は、カテーテル尿 143 検体中

表1. 緑膿菌 297 株からの AAC(6')-Iae の検出率

●緑膿菌 297 株からの AAC(6')-Iae の検出率		
高度 MDRP	91.2%	(31/ 34)
MDRP	55.0%	(121/220)
薬剤耐性	14.0%	(6/ 43)
合 計	53.2%	(158/297)

86 株 (60.1%)、喀痰 139 検体中 67 株 (48.2%)、その他(褥瘡、鼻汁、咽頭) 15 検体中 5 株 (33.3%) と多剤耐性緑膿菌の感染対策として管理が重要視されるカテーテル尿から高頻度に確認された(図2)。

調査した MDRP 株は、全国 41 都道府県の医療機関からの依頼検体より分離された菌株であり、AAC(6')-Iae を有する緑膿菌は、ほぼ全国規模で検出されることが明らかとなった。便宜上、全国都道府県を五つのエリアにくり、MDRP を含む薬剤耐性緑膿菌の分離数に対して AAC(6')-Iae クロマト試薬で陽性反応が認められた菌数で集計した場合、北海道・東北地方 45 株中 21 菌株 (46.7%)、関東甲信越地方 174 株中 103 株 (59.2%)、関西・中部地方 16 株中 3 株 (18.8%)、中国・四国地方 29 株中 17 株 (58.6%)、九州・沖縄地方 33 株中 14 株 (42.4%) であった(図3)。

考 察

今回測定した中で MIC 値が3剤に対してすべて 128 μg/ml 以上を示す高度 MDRP が 34 株あり、そのうち AAC(6')-Iae 保有率は 31 株で 90% 以上であった。これは AAC(6')-Iae が高度 MDRP と関連があり、高度な AMK 耐性に AAC(6')-Iae が関与していることを裏づけるものと考えられた。なお、高度 MDRP であっても、AAC(6')-Iae が検出されなかった3株については、AAC(6')-Ib や AAC(6')-Iaf のような

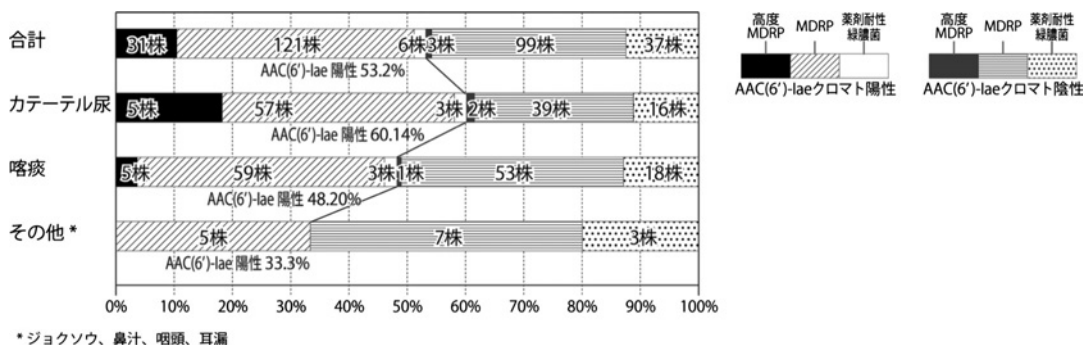


図2. 緑膿菌 297 株の分離材料の内訳と AAC(6')-Iae の検出率

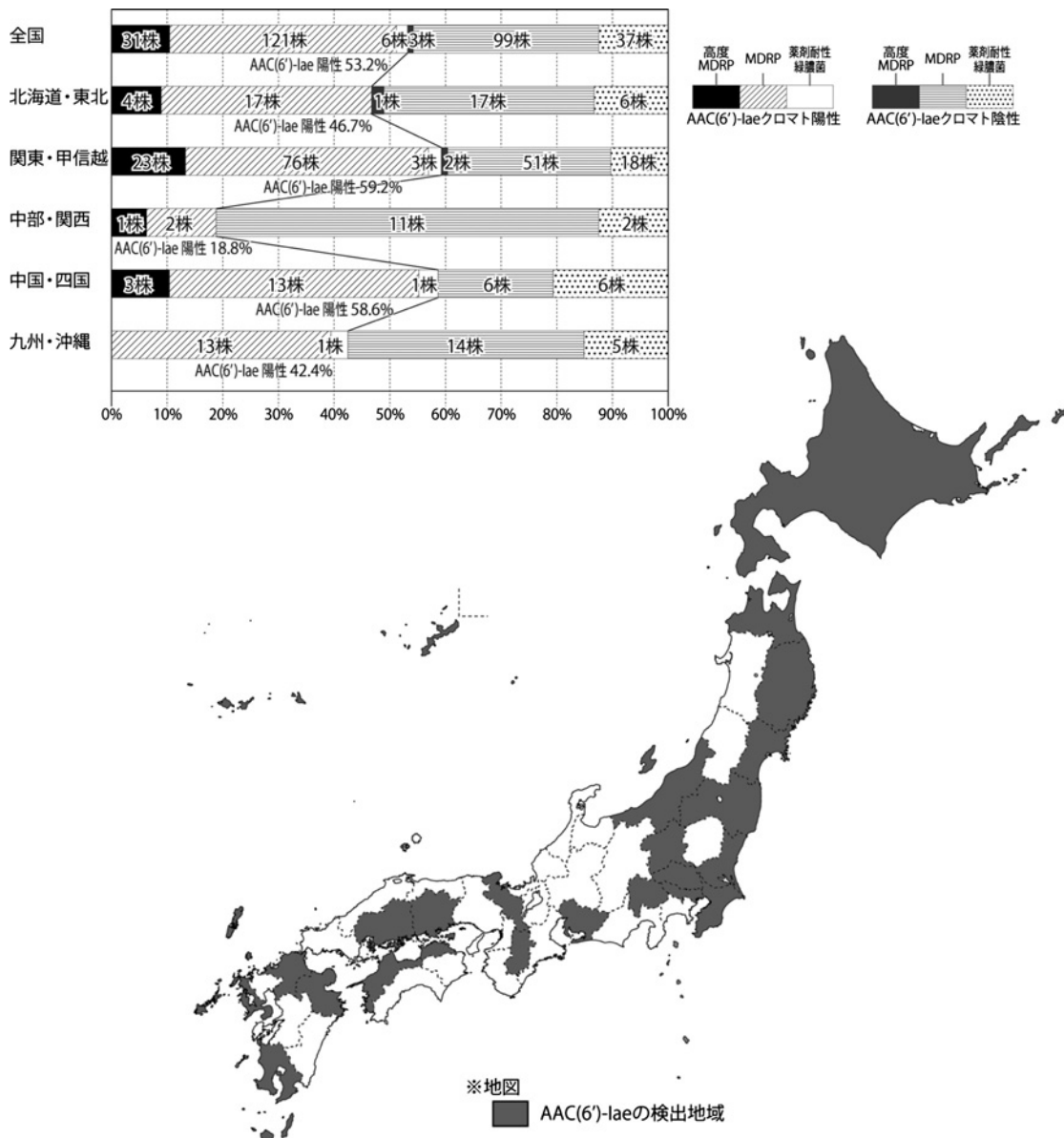


図3. 緑膿菌 297 株の国内分布図状況と AAC(6)-Iae の検出率

他のアミノグリコシド薬剤耐性因子をもつ可能性も考えられる。

一方で、AAC(6)-Iae をもちながら、MDRP でない AMK 感受性緑膿菌も 6 株あった。これら 6 株について PCR を測定したところ、6 株とも *aac(6)-Iae* 遺伝子を所有していることが認められた。*aac(6)-Iae* 遺伝子をもち、AAC(6)-Iae タンパク質が発現されているにもかかわらず、薬剤感受性試験で耐性を示さないこと

は、AAC(6)-Iae の発現量が少ないことが考えられる。これは、緑膿菌の耐性機構のうちの一つで、薬剤投与に対し発現量を増やすことで、誘導的に耐性を上げられるという報告があることから⁸⁾、AAC(6)-Iae をもつことは、将来的に耐性をもつ、しかも高度に耐性をもつ緑膿菌になることが考えられる。薬剤感受性試験で耐性の基準にならなくても、AAC(6)-Iae を検出することが可能であったため、低い AAC(6)-Iae 発現量

でも本試薬は検出可能であることが示唆される。

また、関東・東北地方を中心として広がっていた AAC(6')-Iae 産生緑膿菌は今回の検討調査で、九州・沖縄から北海道までと、全国規模の医療施設に広がっていることが明らかとなった。

AAC(6')-Iae のような薬剤耐性因子の検出は、遺伝子検査法でしか正確な情報が得られず、実際に遺伝子検査を実施できる施設は限られていた。本法はこれまで遺伝子検査が不可能であった施設での検査を可能とし、薬剤耐性因子の検査・診断技術を大きく向上させたと言えるだろう。

臨床材料別に見ると、カテーテル尿から分離同定された菌株より AAC(6')-Iae 産生緑膿菌が約 60% と多く検出されたため、院内での伝播防止を考えるうえでカテーテル尿の取り扱いが重要であると考えられる。今回は臨床検体から AAC(6')-Iae を直接検出できるか否かは実施していないが、本迅速試薬を用いて尿や喀痰から直接 AAC(6')-Iae が検出できれば、より短時間に検出可能となりさらに利便性が大きく増す可能性も考えられよう。

今回の調査で、院内感染対策上重要な菌とし医療施設で監視されている MDRP において、AAC(6')-Iae を保有する株は高度耐性化と関連性が高いこと、そして、それらはすでに全国レベルに広がっていることを改めて認識することができた。遺伝子検査を行わず、培養コロニーを検体として 15 分で判定できることは、広い場所や特別な機器を必要とせず、さらに耐性確認のためにもう一度培養をする必要がなく、時間を大幅に短縮することができるため、院内の感染対策への非常に有用なツールとなりうる。今後はこのようなツールの重要性はますます高まってくるだろう。

外因性プラスミドによって獲得される薬剤耐性因子は AAC(6')-Iae 以外にも多数知られていることから、同様な手法で薬剤耐性因子を病院臨床検査室において、容易に測定できる迅速試薬キットの開発を望む。

BML は、今後も全国レベルでの抗菌薬に対する感受性状況について報告していくとともに、さまざまな薬剤耐性菌に対する国内状況を報告し続けていく考えである。

文 献

- 1) 霜島正浩. 2008. 各都道府県から分離された新鮮臨床分離株 79 万株の各種抗菌薬に対する感受性検査成績 (第 6 報: 2007 年 4 月~2008 年 3 月). 診療と新薬 45(7): 697-753.
- 2) 霜島正浩. 2009. 各都道府県から分離された新鮮臨床分離株 86 万株の各種抗菌薬に対する感受性検査成績 (第 7 報: 2008 年 4 月~2009 年 3 月). 診療と新薬 46(10): 975-1031.
- 3) Sekiguchi, J., T. Asagi, T. Miyoshi-Akiyama, T. Fujino, I. Kobayashi, K. Morita, Y. Kikuchi, T. Kuratsuji, T. Kirikae. 2005. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and its *aac(6')-Iae* gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. Antimicrob. Agents Chemother. 49(9): 3734-3742.
- 4) J. Sekiguchi, T. Asagi, T. Miyoshi-Akiyama, A. Kasai, Y. Mizuguchi, M. Araake, E. Fujino, H. Kikuchi, S. Sasaki, H. Watari, T. Kojima, H. Miki, K. Kanemitsu, H. Kunishima, Y. Kikuchi, M. Kaku, H. Yoshikura, T. Kuratsuji, T. Kirikae. 2007. Outbreaks of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. J. Clin. Microbiol. 45(3): 979-989.
- 5) J. Sekiguchi, K. Teruya, K. Horii, E. Kuroda, H. Konosaki, K. Mizuguchi, M. Araake, A. Kawana, H. Yoshikura, T. Kuratsuji, H. Miyazaki, T. Kirikae. 2007. Molecular epidemiology of outbreaks and containment of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Tokyo hospital. J. Infect. Chemother. 13(6): 418-422.
- 6) Kouda, S., M. Ohara, M. Onodera, Y. Fujiue, M. Sasaki, T. Kohara, S. Kashiyama, S. Hayashida, T. Harino, T. Tsuji, H. Itaha, N. Gotoh, A. Matsubara, T. Usui, M. Sugai. 2009. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the *blaIMP-1* gene cassette in Hiroshima. J. Antimicrob. Chemother. 64(1): 46-51.
- 7) Kitao, T., T. Miyoshi-Akiyama, K. Shimada, M. Tanaka, K. Narahara, N. Saito, T. Kirikae. 2010. Development of an immunochromatographic assay for the rapid detection of AAC(6')-Iae-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 65(7): 1382-1386.
- 8) 花本秀明, 久保亮一. 2008. 検査や化学療法を混乱させる薬剤耐性菌の狡猾な耐性誘導機構. The Chemical Times (1): 11-16.

Detection of AAC(6′)-Iae Producing Strain in *Pseudomonas aeruginosa*

Masahiro Shimojima,¹⁾ Kazuhiro Sakairi,¹⁾ Miho Ogawa,¹⁾ Toru Akiyama,²⁾
Masashi Tanaka,³⁾ Kenji Naraharai,³⁾ Teruo Kirikae,²⁾ Mituo Kaku⁴⁾

¹⁾ Department of Microbiology, BML, Inc.

²⁾ Department of Infectious Diseases, Research Institute, National Center for Global and Medicine

³⁾ Mizuho Medy Co., Ltd., R&D

⁴⁾ Department of Infection Control and Laboratory Diagnostics, Internal Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine

Various medical institutions within the nation have commissioned our company to conduct microbial tests, and we conduct susceptibility tests for each type of antibacterial drug. As such, we can obtain an understanding of incidence trend of drug-resistant bacteria, and we have been reporting drug susceptibility for each type of antibacterial drug in fresh clinical isolates discovered in each prefecture every year starting October 2001 in order to contribute to the transmission of information. Among these isolates, incidence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) has shifted from 0.58% in April 2007–March 2008 (692/120,003 strains)¹⁾ to 3.88% in April 2008–March 2009 (5,012/129,274 strains)²⁾ and to 4.06% in April 2009–March 2010 (5,499/135,463 strains).³⁾ This time, we were provided the opportunity to use “AAC(6′)-Iae Chromat” (Mizuho Medy Co., Ltd.)⁴⁾ that was developed for the purpose to quickly and specifically detect aminoglycoside acetyltransferase AAC(6′)-Iae, which is estimated to be found in at least half of all MDRP, using an easy method; therefore, we attempted to detect AAC(6′)-Iae among the 297 clinical isolate strains of *Pseudomonas aeruginosa* that showed drug resistance in the drug susceptibility tests. *P. aeruginosa* strains that possess the genes which code for AAC(6′)-Iae have been confirmed through molecular biological analysis of isolate strains from medical institutions which have reported high incidence of MDRP.^{5), 7)} Of the 254 strains of MDRP picked up in our company, 152 strains (59.8%) were confirmed to possess AAC(6′)-Iae. In addition, it has also become apparent that these strains are dispersed throughout the nation. Of the 297 drug resistant *P. aeruginosa* strains including MDRP chosen for this study, 34 strains (11.4%) were severe MDPR, or strains which are considered important to focus on when considering measures against nosocomial infections, that showed high MIC levels (i.e. 128 ug/ml or more against the following three drugs: IPM, AMK, and CFX); and, of these strains, 31 strains (91.2%), a very high percentage, possessed AAC(6′)-Iae. As a result, by using “AAC(6′)-Iae Chromat,” it was possible to easily identify within 15 minutes which strains were severe MDRP that produce AAC-Iae. Based on this, the product demonstrated that it was a useful kit for measures against nosocomial infections where promptness is considered important.