

[総 説]

話題の薬剤耐性菌：新型カルバペネマーゼ OXA-48 型産生 *Enterobacteriaceae* の出現

長野則之¹⁾²⁾³⁾・長野由紀子²⁾・荒川宜親³⁾

¹⁾ 船橋市立医療センター 微生物検査室

²⁾ 国立感染症研究所 細菌第二部

³⁾ 名古屋大学大学院医学系研究科 分子病原細菌学/耐性菌制御学

(平成 25 年 7 月 16 日受付)

イミペネムやメロペネムなどのカルバペネム系抗菌薬は重篤な細菌感染症の治療に用いられるいわゆる“last resort”としての重要な役割をもつことからカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の広がりや臨床上新たな懸念の一つとして認識されてきている。本稿では新型カルバペネマーゼの OXA-48 型産生 CRE について述べる。OXA-48 型カルバペネマーゼのプロトタイプである OXA-48 産生株は 2001 年にトルコで分離された *Klebsiella pneumoniae* で初めて確認されて以降欧州各国で急速に広がり問題となってきている。最近では米国、カナダからも報告されている。国内では 2012 年 11 月東南アジアで治療歴を有する海外帰国事例よりカルバペネム系薬の MIC が軽度上昇した OXA-48 カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* 2 株及び *E. coli* 1 株が初めて確認された。OXA-48 カルバペネマーゼ単独産生 *K. pneumoniae* では広域スペクトラムセファロスポリン系薬感性であったため日常検査での検出は困難と考えられるが、tazobactam/piperacillin 耐性且つ modified Hodge test 陽性が検出の指標として有用であった。CRE をはじめ多種多様な薬剤耐性菌が医療機関に入ってくることは避けられない事実である。そこで海外からの新型耐性菌の流入を引き続き監視し、早期検出と適切な感染制御の実施によりそれらの国内での蔓延を防止する必要がある。

Key words: OXA-48 型, カルバペネマーゼ, カルバペネム低感受性, CRE, Tn1999

1. Maasstad story

2011 年 3 月オランダロッテルダム市のマースタット病院に火傷及び気道傷害で入院した 73 歳男性が入院一週間後多剤耐性 *Klebsiella pneumoniae* による血流感染症を発症しメロペネムの治療を受けた。5 日後患者はアムステルダム市スロテルヴァール病院に転院したが入院時発熱が続いており血液培養でカルバペネム系抗菌薬の感受性が低下した多剤耐性 *K. pneumoniae* (ertapenem MIC, 2 µg/ml ; meropenem MIC, 0.38 µg/ml ; imipenem MIC, 0.5 µg/ml) が検出されたため抗菌薬をメロペネムからコリスチンにか

えて治療が施された。直腸スワブからも同じ多剤耐性 *K. pneumoniae* が検出され、解析の結果 OXA-48 カルバペネマーゼ及び CTX-M-15 extended spectrum β-lactamase (ESBL) 産生 *K. pneumoniae* であることが確認された。後にこの株によるマースタット病院での大規模アウトブレイクが明らかとなってくるのである。このアウトブレイクは 2009 年中頃に始まり 2010 年 6 月までには ICU の入院患者の間で数例の感染症例が見つかった。しかしながら転院先の病院でこの患者からの多剤耐性 *K. pneumoniae* の検出が明らかにされてからようやくマースタット病院で詳細な検査が実施され OXA-48 カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* が確認されたのは翌年の 5 月で、その時点で初めて対応に動き出したのである。結果的にこのアウトブレイクは 1 年以上何ら適切な対応策が講じられないまま 100 人以上もの患者が感染し、本菌による感染症が原因で死亡した可能性の高い患者は少なくと

著者連絡先：(〒273-8588) 千葉県船橋市金杉 1-21-1
船橋市立医療センター微生物検査室
長野則之
TEL: 047-438-3321 内線 5203
E-mail: naganoynd@d3.dion.ne.jp

も十数名を数える。また感染患者と同室となり感染のリスクに曝された患者は4000名にまで至った。オランダ医療検査官は特に感染防御に携わる臨床微生物学者らやアドバイザーらが多くの感染症例に気づいていながらも必要な対策を講じなかったこと、多くのスタッフが効果的な協力体制を構築しなかったことでこのような重大で広範囲且つ長期のアウトブレイクを引き起こすに至ったものと結論付けた¹⁾²⁾。

多種多様な薬剤耐性菌が医療機関に入ってくることは避けられない事実である。とすればマースタット病院の教訓を軽んじることなくそのような耐性菌の存在をいち早く確認し、直ちに必要な対策を実行に移せる準備万端の体制で向き合うほかにすべはない。

II. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* の広がり

折しも2013年3月5日米国疾病予防管理センター(CDC)はカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)による感染症の増加に対し早急な対応が必要であるとの警告を発した(http://www.cdc.gov/media/releases/2013/p0305_deadly_bacteria.html)。イミペネムやメロペネムなどのカルバペネム系抗菌薬は重篤な細菌感染症の治療に用いられるいわゆる“last resort”としての役割をもつが主に *K. pneumoniae* や *Escherichia coli* などのCREはこの薬剤を分解するカルバペネマーゼを産生し耐性を獲得する。腸内細菌科の細菌が産生する主なカルバペネマーゼとしてはアミノ酸配列に基づく Ambler 分類でクラス A に属する KPC 型などのβ-ラクタマーゼ、クラス B に属する IMP 型、VIM 型、NDM 型などのメタロβ-ラクタマーゼ、さらには近年欧州を中心に急激に広がりつつある新型カルバペネマーゼとしてクラス D に属する OXA-48 型β-ラクタマーゼがあげられる。米国では KPC 型カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* が問題となっており1996年にノースカロライナ州で初めて検出されてから³⁾、東海岸でのアウトブレイクを経てここ10年の間に42の州に広がりを見せてきている。また、カルバペネム系薬耐性の *Klebsiella* 属菌が7倍、腸内細菌科の菌種全般では4倍に増えてきている。最近ではコロラド州の病院で NDM-1 メタロβ-ラクタマーゼ産生株のアウトブレイクが発生し、欧州で広がっている OXA-48 カルバペネマーゼ産生株も新たに検出されてきている。さらにこのような CRE に血流感染した場合の症状の重篤化、致死率の高さが危惧され、この度の注意喚起に至ったものと思われる。

日本国内においては、厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) の公開情報 (<http://www.nih-janis.jp>) によれば2012年では *E. coli* のイミペネム耐性は0.1%、*K. pneumoniae* では0.2%と現状では低率である。また CRE としては IMP 型メタロβ-ラクタマーゼ産生株が多いのに対して、海外で問題となっている NDM 型や VIM 型メタロβ-ラクタマーゼ産生株、KPC 型カルバペネマーゼ産生株の分離はまだ希である。2012年11月には国内で初めて OXA-48 カルバペネマーゼ産生株が確認された⁴⁾。

本稿では OXA-48 型カルバペネマーゼ産生 *Enterobacteriaceae* についてその検出などを中心に紹介する。

III. OXA-48 カルバペネマーゼ産生 *Enterobacteriaceae* の検出

OXA-48 カルバペネマーゼ産生株については、血流感染症を発症すると死亡率が高く、院内感染症のみならず尿路感染症や肺炎などの市中感染症の原因にもなり得る。また、カルバペネム系薬に加えフルオロキノロン系やアミノグリコシド系薬にも広範囲に耐性を示す傾向があり、治療薬としてコリスチン(国内では現時点で未承認)やチゲサイクリンなど有効性が期待できる選択肢が極めて限られている。このようなことから OXA-48 カルバペネマーゼ産生株を検出することは臨床的に重要であるとともに医療施設や国内への蔓延を防止する観点からも重要となる。

1. 多様な薬剤感受性プロファイル

OXA-48 カルバペネマーゼはペニシリン系薬の分解活性が高くカルバペネム系薬の分解活性は低いか中程度という酵素特性を有する。また広域スペクトラムセファロスポリン系薬に対する分解活性は cefotaxime などでは極めて低く、ceftazidime ではほとんど見られない⁵⁾。

われわれは日常検査でまず薬剤感受性のプロファイルから薬剤耐性菌の存在を推定しなければならない。しかしながらこのような酵素特性を示すことから多くの OXA-48 カルバペネマーゼ産生株でカルバペネム系薬の MIC が低値となり米国 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI: 米国臨床検査標準化協会) や The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST: 欧州抗菌薬感受性試験委員会) ガイドラインでカルバペネム感性和判定されてしまうことがある。このことが隠れた耐性菌としての OXA-48 カルバペネマーゼ産生株の見逃し、ひいては発見の遅れによる治療の失敗や蔓延化を引き

Table 1. MICs of antimicrobials for OXA-48-producing *K. pneumoniae* and *E. coli* including the case reported by us and others from the literatur

	MIC (µg/ml) for the following strains ^a							
	Ec	Kp1	Kp2	TraJ53-2/ Kp2	TraJ53-2/ Kp2	<i>E. coli</i> J53-2	<i>K. pneumoniae</i> 5837 ^b	<i>K. pneumoniae</i> 7680 ^b
	OXA-48 CTX-M-55	OXA-48	OXA-48 CTX-M-15	OXA-48	CTX-M-15		OXA-48 CTX-M-15	OXA-48 CTX-M-15
	TEM-1		TEM-1		TEM-1		OmpK36 ⁺	OmpK36 ⁻
Ampicillin	>16	>16	>16	>16	>16	≤4		
Amoxicillin/clavulanate	>16	>16	>16	>16	>16	≤8	>256	>256
Piperacillin	>64	>64	>64	64	>64	≤8		
Piperacillin/tazobactam	>64	>64	>64	64	≤8	≤8	>256	>256
Cefazolin	>16	≤4	>16	8	>16	≤4		
Cefaclor	>16	>16	>16	>6	>16	≤8		
Cefotiam	>16	≤8	>16	≤8	>16	≤8		
Cefotaxime	>128	1	>128	≤0.5	>128	≤0.5	>256	>256
Cefotaxime/clavulanate	>32/4	0.25/4	>32/4	0.25/4	≤0.12/4	≤0.12/4		
Ceftazidime	>128	≤0.5	>128	≤0.5	16	≤0.5	96	>256
Ceftazidime/clavulanate	16/4	≤0.12/4	4/4	0.25/4	≤0.12/4	≤0.12/4		
Ceftriaxone	>64	≤0.5	>64	≤0.5	>64	≤0.5		
Cefpodoxime	>64	1	>64	2	>64	1		
Cefozoplan	>16	≤2	>16	≤2	>16	≤2		
Cefoperazone/sulbactam	>32	≤16	>32	≤16	32	≤16		
Aztreonam	>64	≤0.5	>64	≤0.5	64	≤0.5	>256	>256
Cefpirome	>16	≤8	>16	≤8	>16	≤8		
Cefepime	>32	≤1	>32	≤1	16	≤1	128	>256
Cefoxitin	>32	4	4	8	≤2	4	6	96
Cefmetazole	16	2	2	1	1	≤0.5		
Cefotetan	16	≤1	2	≤1	≤1	≤1		
Imipenem	2	2	2	2	≤1	≤1	1	>32
Meropenem	2	2	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	2	>32
Colistin ^c	0.125	0.125	0.125					

^aTra, transconjugant
^bData are from reference 9)
^cMIC results of the Etest

起こす危険性につながる事となる。

2012年11月に国内で初めて分離された OXA-48 カルバペネマーゼ産生株とその接合伝達株の MIC を Table 1 に示す。東南アジアの現地医療機関での治療歴を有し千葉県内の医療機関に転院した 60 歳代男性の入院直後採取の気管吸引痰から *E. coli* Ec 及び *K. pneumoniae* Kp1, さらに鼠径部擦過物より *K. pneumoniae* Kp2 の 3 株が検出された。これらの Kp1, Kp2, Ec における imipenem と meropenem の MIC はいずれも 2 µg/ml と軽度上昇しておりカルバペネマーゼ産生性が疑われた。また, tazobactam/piperacillin も耐性 (MIC>64 µg/ml) であった。Kp1 の場合

広域スペクトラムセファロスポリン系薬, モノバクタム系薬は感性であった。一方 Kp2 と Ec ではセフェム系薬, モノバクタム系薬は耐性で ceftazidime の MIC はクラブラン酸添加により低下し ESBL 産生性が疑われた (Table 1)。さらに Ec ではアミノグリコシド系薬, フルオロキノロン系薬なども耐性で, 多剤耐性を獲得していた⁹⁾。

エルタベネムディスクを用いた modified Hodge test では Kp1, Kp2, Ec の 3 株共に陽性でカルバペネマーゼ産生性が確認された (Fig. 1)。さらに double-disk synergy test では Kp2 と Ec で ceftazidime, cefotaxime に不定型な増殖阻止帯の拡張が観察され, こ

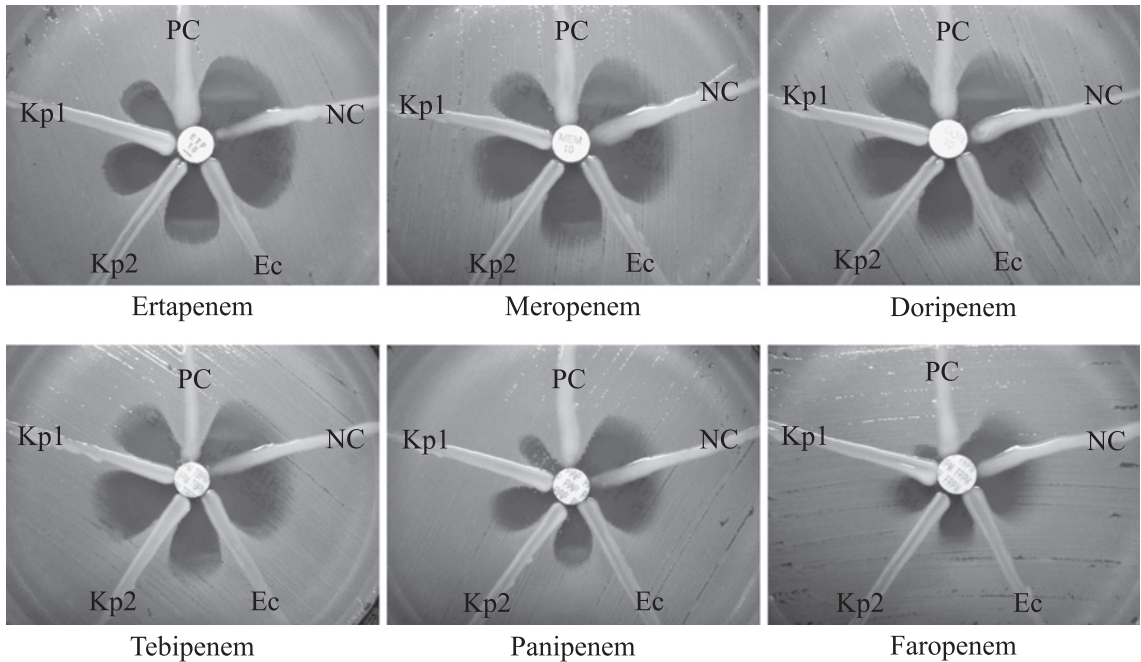


Figure 1. Modified Hodge test using different carbapenems and a penem as the indicator drugs. Carbapenemase production is demonstrated by isolates *K. pneumoniae* Kp1, *K. pneumoniae* Kp2, *E. coli* Ec and positive control (PC, KPC-2-producing *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705) but not the negative control (NC, non-carbapenemase-producing *K. pneumoniae* clinical isolate).

これらの株のESBL産生性とceftazidime, cefotaximeの分解能の低いカルバペネマーゼ産生性が示唆された。一方 sodium mercaptoacetate (SMA), EDTA, 及び 3-aminophenylboronic acid (APB) を用いた酵素阻害試験では3株共に陰性で、クラスA, クラスBカルバペネマーゼの存在は否定された。

耐性遺伝子のPCR検索により3株でOXA-48型カルバペネマーゼ遺伝子 (OXA-48A [5'-TTGGTGGCA TCGATTATCGG-3']/OXA-48B [5'-GAGCACTTCT TTTGTGATGGC-3'])⁶⁾, 加えてKp2とEcでCTX-M-1型遺伝子が検出された。これらの構造遺伝子全長の塩基配列解析の結果, Kp1ではOXA-48, Kp2ではOXA-48及びCTX-M-15, EcではOXA-48及びCTX-M-55遺伝子と同定された (Table 1)。Kp1とEcはそれぞれCTX-M-15とCTX-M-15のvariantであるCTX-M-55 (Ala80Val) を産生していたが, このCTX-M-55はCTX-M-15と同様にceftazidimeの分解性を高めていることが報告されている⁷⁾。これによりKp1とEcではOXA-48型カルバペネマーゼ単独では分解し難いceftazidimeやcefotaximeにも耐性を示していたが, OXA-48遺伝子のみ保有のKp1では多くの報

告にあるように広域スペクトラムセファロsporin系薬が感性であった。これらのKp1, Kp2, Ecは tazobactam/piperacillin 耐性を示していたが, 接合伝達により得られたOXA-48遺伝子のみを保有するそれぞれの接合伝達株も tazobactam/piperacillin 耐性で, 且つ modified Hodge test 陽性であった。このことから広域スペクトラムセファロsporin系薬が感性であった場合でも, modified Hodge test に加えて tazobactam/piperacillin 耐性がOXA-48カルバペネマーゼ産生性のスクリーニングに有用であると考えられた。

先に述べたようにOXA-48カルバペネマーゼ産生株は特にESBL産生性を伴わない場合はカルバペネム系薬のMICが低値で, 広域スペクトラムセファロsporin系薬感性であることから検出が困難である⁸⁾。しかしながらその多くが主にCTX-M-15などのESBLを共産生しており, その結果広域スペクトラムセファロsporin系薬にも耐性を示すようになる。またTable 1の海外既報株に示すように外膜蛋白の欠損など他の耐性メカニズムを併せ持つことによりカルバペネム系薬の耐性レベルが上昇する⁹⁾。このような背景からOXA-48カルバペネマーゼ産生株につい

てはβ-ラクタム薬に多様な薬剤感受性プロファイルを示し得ることに注意が必要である。

2. Modified Hodge test

Poirelらは腸内細菌科の菌種におけるカルバペネマーゼ産生性の可能性としてertapenem $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ 、またはimipenemあるいはmeropenem $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ をスクリーニングの指標として提案している¹⁰⁾。国内で初めて分離されたOXA-48カルバペネマーゼ産生株3株についてはimipenemとmeropenemのMICは共に $2 \mu\text{g/ml}$ と軽度上昇していたことからカルバペネマーゼ産生性あるいは外膜蛋白の欠損が考えられた。そこでertapenemディスク($10 \mu\text{g}$ 含有)を用いたmodified Hodge testを実施したところFigure 1に示すように3株共に明瞭な陽性反応が観察された。しかしながら国内ではertapenemディスクの入手が困難なことからmeropenemをはじめ5種のカルバペネムやベネム系薬のディスクを用いmodified Hodge testを行った結果faropenemの場合は不鮮明ではあったものの、他の薬剤でも陽性の判定が可能であることが確認された。但しNDM-1型をはじめいくつかのカルバペネマーゼではmodified Hodge testが必ずしも陽性を示さない。またわれわれの経験でもDHA-1型などのpAmpCβ-ラクタマーゼではmodified Hodge test陽性を示すことから注意が必要であり、この場合ertapenemディスクにAmpCβ-ラクタマーゼの阻害剤であるcloxacillinを添加することでこの偽陽性反応を回避している。

IV. OXA-48カルバペネマーゼ産生 *Enterobacteriaceae* の拡散に関わる因子

1. プラスミド

OXA-48カルバペネマーゼは2001年にトルコイスタンブールで分離されたカルバペネム系薬耐性*K. pneumoniae* 11978で初めて確認された。この株は広域スペクトラムセファロスポリン、セファマイシン、モノバクタム、カルバペネム系薬を含むすべてのβ-ラクタム薬に高度耐性を示し、SHV-2a、TEM-1、OXA-47を同時に産生すると共に36-kDa porinの欠損が認められた。OXA-48遺伝子はおよそ70 kbの自己伝達可能なプラスミドにコードされていたがこのプラスミドは他の耐性因子は保有していなかった⁶⁾。2009年以降は欧州各国、地中海沿岸地域、中東地域にわたって*K. pneumoniae* や*E. coli*をはじめ種々の腸内細菌科の菌種でOXA-48カルバペネマーゼ産生株感染症の散発事例やアウトブレイク事例が報告され始めた¹⁰⁾¹¹⁾。これらの地域で報告されているOXA-48遺伝

子がやはり単独の耐性因子として70 kbサイズの伝達性プラスミド(Inc L/Mタイプ)上に存在していたことから腸内細菌科の菌種における本遺伝子の拡散の大部分がこの単一プラスミドの流行によるものと考えられた。後に*K. pneumoniae* 11978由来プラスミドの全DNA配列解析がなされた結果62.3 kbサイズのInc L/Mタイププラスミドを骨格とし二つの挿入配列IS1999の間にOXA-48遺伝子を含む領域が挟まれた構造をもつ複合トランスポゾンTn1999が確認された¹²⁾。一方、ごく最近ではカナダや北米からもOXA-48カルバペネマーゼ産生株が報告されてきているが^{13)~15)}、米国の最初の報告ではこのInc L/Mタイプの流行性プラスミド上にCTX-M-9遺伝子の共存が確認され、カナダの報告ではOXA-48遺伝子と共にTEM-1遺伝子がおよそ114 kbのプラスミドで検出されている。また、Inc L/Mタイプ以外にInc PプラスミドやInc A/Cプラスミドによる媒介も報告されてきている¹⁶⁾¹⁷⁾。

国内で初めて分離されたOXA-48カルバペネマーゼ産生株3株とそれらの接合伝達株のホールプラスミドのプロファイルを図2に示す。OXA-48遺伝子は3株に共通したおよそ70 kbのプラスミドと共に*E. coli* J53-2 Azifに伝達した。これらのプラスミドはCTX-M遺伝子を保有していなかったことから既報のようにOXA-48遺伝子とCTX-M遺伝子が異なるプラスミドにより媒介されていることが明らかとなった。また、Kp2ではおよそ4.4 kbのプラスミドのみがcefotaxime耐性のフェノタイプと共に伝達した接合伝達株が得られ、このプラスミド上にCTX-M-15及びTEM-1遺伝子の存在が確認された。これらのOXA-48遺伝子保有プラスミドのPCRによるInc typing¹⁶⁾¹⁸⁾を試みたが決定できなかった。

2. 可動遺伝子トランスポゾン

上述のようにトルコの*K. pneumoniae* 11978由来プラスミドの配列解析からOXA-48遺伝子は複合トランスポゾンTn1999上に担われていることが明らかとなったが、以降さらに3種のヴァリエントTn1999.2、Tn1999.3、Tn1999.4が報告されている^{19)~21)}。Figure 3に示すようにTn1999ではOXA-48遺伝子のスタートコドンの26 bp上流に挿入配列IS1999が存在している。このIS1999のトランスポサナーゼをコードする配列内に-35領域と-10領域に相当する塩基配列が見いだされることからOXA-48遺伝子発現のためのプロモーター配列を供与しているものと推測される。国内で初めて分離されたOXA-48カルバペネマーゼ産生株3株についてOXA-48遺伝子の周辺構造およそ

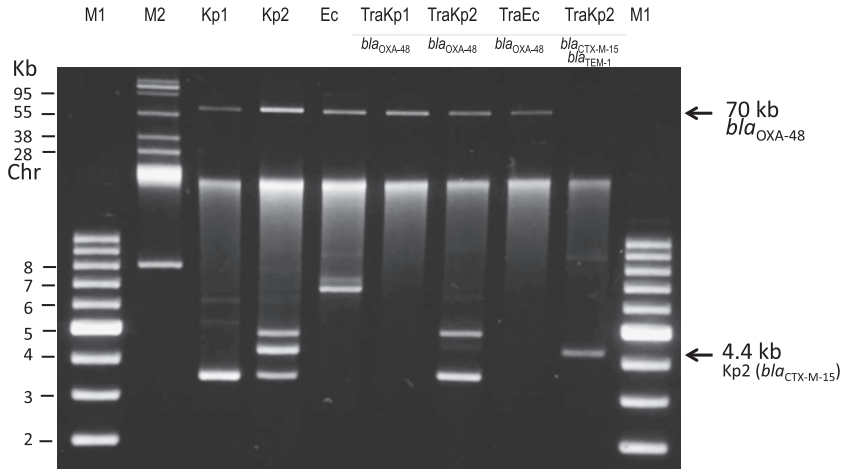


Figure 2. Plasmid profiles of three isolates, *K. pneumoniae* Kp1, *K. pneumoniae* Kp2, *E. coli* Ec and their transconjugants

Lanes: M1, supercoiled molecular marker; M2, BAC-Tracker Supercoiled DNA Ladder; Tra, transconjugant using *E. coli* J53-2 strain as recipient.

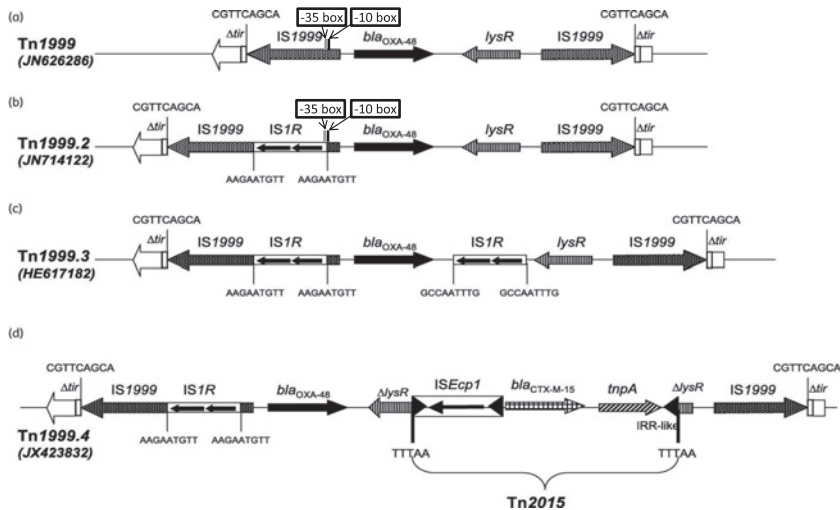


Figure 3. Schematic representation of the transposon Tn1999 carried by *K. pneumoniae* 11978, compared with the other Tn1999 variants

The arrows represent genes and their orientation. The putative promoter regions of *bla*_{OXA-48} is indicated. The figure is modified from reference 21.

6.3 kb について配列解析を行った結果既報の Tn1999.2 の配列と一致していた (GenBank accession no. JN714122)。この Tn1999.2 は 2007 年トルコのアウトブレイク株に認められたもので、OXA-48 遺伝子上流の IS1999 に IS1R が挿入されていることで本遺伝子発現のための strong promoter 配列を供与している。Carr er らは Tn1999 上の OXA-48 遺伝子の

imipenem 加水分解活性 (23 [±0.002] mU/mg of protein⁻¹) と Tn1999.2 上の OXA-48 遺伝子の活性 (48 [±0.013] mU/mg of protein⁻¹) とを比較し、Tn1999.2 上の OXA-48 遺伝子の方がより発現性が高いことを示している¹⁹⁾。また、Tn1999.3 はイタリアで分離された単一の *E. coli* 株で確認されたが Tn1999.2 と異なり OXA-48 遺伝子の下流にも IS1R が挿入されてい

る²⁰。また、OXA-48 カルバペネマーゼ産生株の多くが CTX-M-15 等の ESBL 同時産生で各々異なるプラスミドに由来しているが Tn1999.4 のように Tn1999.2 に Tn2015 が挿入された結果 OXA-48 と CTX-M-15 の二つの遺伝子を担うトランスポゾンの存在が確認されている²¹。

3. 複数クローンの拡散

OXA-48 遺伝子の広がりや *K. pneumoniae* の特定クローンとの関連性については、米国 CDC の報告にみられるような KPC 型カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* と multilocus sequence typing (MLST) 解析に基づく sequence type (ST) 258 との関連性²² のようには明確ではない。冒頭で述べたオランダ アムステルダムで 2011 年 4 月に確認された OXA-48 カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* は、OXA-48 遺伝子が Tn1999.2 に担われた形でおよそ 62 kb のプラスミド上に存在し、且つ CTX-M-15 遺伝子が別のプラスミド上に存在していたが ST395 に属していた。モロッコやフランスでも ST395 に属する同じ OXA-48 カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* が確認されており単一クローンの拡散が示唆されている¹。また、ST353 はロンドンでのアウトブレイク、ST221 はアイルランドのアウトブレイク、ST11 はギリシャのアウトブレイクに関連している²³⁻²⁵。この *K. pneumoniae* ST11 クローンは、上述の KPC 遺伝子の蔓延に関わる主要な ST258 クローンの single-locus mutant であり、またアジア、ハンガリーでは CTX-M-15 ESBL 産生性の主な *K. pneumoniae* クローンでもある^{26/27}。なお、OXA-48 カルバペネマーゼ産生株として初めて報告されたトルコの *K. pneumoniae* 11978 は ST14¹ であり、その他 ST831, ST199, ST15, ST17 などが報告されてきている¹³⁻¹⁵。ごく最近の報告ではエルサレムにおける新生児集中治療室のアウトブレイクに ST39 に属する OXA-48 カルバペネマーゼ、CTX-M-14ESBL 同時産生 *K. pneumoniae* が関わっていた²⁸。

このように OXA-48 遺伝子の拡散の多くに特定のプラスミド、トランスポゾンが関わっているが、*K. pneumoniae* におけるこの OXA-48 カルバペネマーゼの流行には種々の sequence type が関与しているものと考えられる。

Kp1, Kp2, Ec はそれぞれ ST45, ST20, ST354 と同定されたがこれらの sequence type は CTX-M-15 などの ESBL 産生株や KPC-2 カルバペネマーゼ産生株で認められているもので、既報のアウトブレイクに関わる OXA-48 型カルバペネマーゼ産生株のタイプとは異なっていた。

E. coli における OXA-48 産生株の報告はトルコ、イスラエル、セネガル、フランス、イタリアからと少ないが^{20/29-32}、特にアイルランドで CTX-M-15 ESBL の世界規模での蔓延に関わる多剤耐性尿路病原性大腸菌の特定クローン *E. coli* O25b:H4-ST131 に OXA-48 カルバペネマーゼ産生株が初めて報告されたことが注目される³³。これらの報告で OXA-48 遺伝子はおよそ 50-70 kb サイズのプラスミド上に存在しているが、イタリア由来の *E. coli* では OXA-48 遺伝子が Tn1999.3 に担われていることが初めて見いだされた。ごく最近では腸管外病原性大腸菌として新たに出現してきたクローン ST127 に属する *E. coli* の OXA-48 産生株が報告されたが、本株では染色体上に OXA-48 遺伝子を担う Tn1999.2 が挿入されていた³⁴。

4. メディカルツーリズム

国内で初めて OXA-48 カルバペネマーゼ産生株が確認された事例は東南アジア地域の現地医療機関に入院後国内の医療機関に転院した背景を有していた。海外での入院歴を有する患者の国内への転院に伴う OXA-48 型カルバペネマーゼ産生株の流入が示唆される事例についてはモロッコからフランスへの *K. pneumoniae* ST395 をはじめ、サウジアラビアやインドでの入院歴を有する患者の米国の医療機関への入院、インドからオランダへの転院、ヨルダンやグルジアからイスラエルへの転院、バングラディッシュからシンガポールへの転院など多くの報告がなされている^{15/35-38}。

このように OXA-48 型カルバペネマーゼ産生株や KPC 型、NDM 型、VIM 型産生 CRE の流行地域への海外旅行や現地医療機関への入院、メディカルツーリズムがこれらの CRE の世界規模での拡散の一因となっている危険性を認識することが重要であり³⁹、医療機関内、ひいては地域内、国内での拡散を食い止めるなければならない。

厚生労働省では 2013 年 3 月 22 日付の事務連絡で海外の医療機関において入院治療を受けていた患者を受け入れる際には各種耐性菌のスクリーニングを実施するよう呼びかけている。

V. OXA-48 型カルバペネマーゼヴァリエント

OXA-48 型カルバペネマーゼには OXA-48 の他に OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-247 などのヴァリエントがこれまでに報告されている。

OXA-181 はインドで初めて確認され⁴⁰、その後インドからの輸入事例がオランダ、フランスなどいくつ



Figure 4. Amino acid sequence alignment of OXA-48 and other variants, OXA-163 and OXA-181

Dashes indicate identical amino acids. Asterisks indicate the 4-amino-acid deletion in OXA-163. Numbering is accordance to class D β -lactamase (DBL) numbering.

かの国で報告されている^{36)40)~43)}。また、最近では米国、カナダでも検出されてきている^{13)~15)}。OXA-181 (GenBank accession no. JN205800) は OXA-48 (GenBank accession no. JN714122) と 4 アミノ酸違いであるが OXA-48 と類似した酵素特性を有しカルバペネム系薬や ceftazidime などの広域スペクトラムセファロsporin、モノバクタム系薬に対する分解活性は低い⁶⁾⁴⁰⁾。OXA-163 (GenBank accession no. HQ700343) はアルゼンチンで初めて報告され⁴⁴⁾、その後エジプトで海外渡航歴のない患者から分離されている⁴⁵⁾。OXA-163 では OXA-48 のアミノ酸配列と比較した場合 222~225 位の 4 つのアミノ酸欠失及び 220 位の serine から asparatic acid へのアミノ酸置換がみられ、カルバペネムの分解性が OXA-48 より低く、広域スペクトラムセファロsporin 系薬の分解活性が高い特性を示す (Fig. 4)。

VI. 細菌検査の役割

われわれの経験からも一旦発生した院内感染を制御するのは大変難しく、発生初期に対応することの重要性を認識している。CLSI や EUCAST では CRE やカルバペネマーゼ産生菌の検出を考慮したカルバペネム系薬の新ブレイクポイント設定により患者の治療目的でのカルバペネマーゼ産生性の検出は必要ないとの見解を示している。細菌検査は患者治療を目的としたデータの提供を第一義としているが、同時に薬剤耐性菌の出現や院内感染を早期に察知し、速やかに対策を

講じることも重要な使命であると考え。それ故 CLSI の新基準を取り入れてカルバペネマーゼなどの耐性メカニズムの検出を感染管理などの目的のみに限定してしまい、日常的に行わなくなることが薬剤耐性菌および院内感染への対応の遅れにつながるのではないかと懸念を筆者は抱いている。さらには肝心の治療面においてもブレイクポイントのみに頼った結果の報告に対する懸念は払拭されない。Cuzon らによるフランスのアウトブレイク株及び Voulgari らによるギリシャのアウトブレイク株の報告では、CLSI ブレイクポイントで imipenem が “I” あるいは “S”，meropenem が “S” と判定されるような OXA-48 カルバペネマーゼ産生 *K. pneumoniae* の感染症に対し imipenem 単独あるいは併用療法の治療効果が期待できない事例が認められている²⁵⁾⁴⁶⁾。

もっと基本的なこととして CLSI や EUCAST の設定しているブレイクポイントは、日常検査での薬剤感受性試験が正確に実施されていることを前提にしているがはたして日常検査で得られる MIC は絶対値として正確かという検査の側からの懸念も否定できない。使用する自動測定機の機種による MIC の違い、接種菌量の差による MIC への影響、そもそも精度管理における ± 1 管の許容範囲やブレイクポイント付近の精度が不明であることなど様々な要因が考えられる。

薬剤感受性試験の成績だけでは全てのカルバペネマーゼ産生菌を検出することはできない。われわれの経験からいえば OXA-48 カルバペネマーゼ産生株に

ついてはカルバペネム系薬の MIC が軽度上昇を示す株あるいはカルバペネム系薬に感性を示す場合でも tazobactam/piperacillin 耐性を示す株については CRE を疑い、各種の β-ラクタマーゼ酵素阻害試験や modified Hodge test などにより表現型特性を調べる。最終的には PCR などによる遺伝子の確認が必要となる。

CRE の国内での蔓延を防止する上で細菌検査の担う役割は大きい。今回 OXA-48 カルバペネマーゼ産生株が初めて検出された医療機関では細菌検査室での本菌株の早期検出、その後の病院全体での迅速な対応により完全な封じ込めに成功した。この医療機関では日頃より院内感染対策について職種を超えた職員間の連携が密であり、適正な院内感染対策が実行されていると感じられたことをつけ加えたい。

謝辞：本報告には成田赤十字病院検査部 遠藤康伸先生、船橋市立医療センター微生物検査室 外山雅美先生、国立感染症研究所細菌第二部 松井真理先生並びに柴山恵吾先生の諸先生方との共同研究の内容が含まれます。ここに深謝申し上げます。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- Potron, A., J. Kalpoe, L. Poirel, et al. 2011. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin. Microbiol. Infect.* 17: E24-26.
- Sheldon, T. 2012. Dutch microbiologists are disciplined for delays during pneumonia outbreak. *BMJ* 344: e755.
- Yigit, H., A.M. Queenan, G.J. Anderson, et al. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β-lactamase, KPC-I, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1151-1161.
- Nagano, N., Y. Endoh, Y. Nagano, et al. 2013. First report of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan from a patient returned from Southeast Asia. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66: 79-81.
- Poirel, L., T. Naas, P. Nordmann. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 24-38.
- Poirel, L., C. Héritier, V. Tolun, et al. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 15-22.
- Novais, A., R. Cantón, T.M. Coque, et al. 2008. Mutational events in cefotaximase extended-spectrum β-lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2377-2382.
- Cuzon, G., T. Naas, P. Boqaerts, et al. 2008. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing β-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 3463-3464.
- Pitart, C., M. Solé, I. Roca, et al. 2011. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 4398-4401.
- Poirel, L., A. Potron, P. Nordmann. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J. Antimicrob. Chemother.* 67: 1597-1606.
- Nordmann, P., T. Naas, L. Poirel. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 1791-1798.
- Poirel, L., R.A. Bonnin, P. Nordmann. 2012. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 559-562.
- Mataseje, L.F., D.A. Boyd, L. Hoang, et al. 2013. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase-48 and oxacillinase-181 in Canada, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 157-160.
- Lascols, C., G. Peirano, M. Hackel, et al. 2013. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 130-136.
- Mathers, A.J., K.C. Hazen, J. Carroll, et al. 2013. First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the "menace" arrives in the new world. *J. Clin. Microbiol.* 51: 680-683.
- Carrër, A., L. Poirel, M. Yilmaz, et al. 2010. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 1369-1373.
- Ktari, S., B. Mnif, F. Louati, et al. 2011. Spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 β-lactamase in a Tunisian university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 1644-1646.

- 18) Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, et al. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63: 219-228.
- 19) Carrër, A., L. Poirel, H. Eraksoy, et al. 2008. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2950-2954.
- 20) Giani, T., V. Conte, V. Di Pilato, et al. 2012. *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 2211-2213.
- 21) Potron, A., P. Nordmann, E. Rondinaud, et al. 2013. A mosaic transposon encoding OXA-48 and CTX-M-15: towards pan-resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 68: 476-477.
- 22) Kitchel, B., J.K. Rasheed, J.B. Patel, et al. 2009. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3365-3370.
- 23) Woodford, N., J.F. Turton, D.M. Livermore. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35: 736-755.
- 24) Canton, R., M. Akova, Y. Carmeli, et al. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 413-431.
- 25) Voulgari, E., O. Zarkotou, K. Ranellou, et al. 2012. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J. Antimicrob. Chemother.* 68: 84-88.
- 26) Lee, M.Y., K.S. Ko, C.I. Kang, et al. 2011. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 38: 160-163.
- 27) Damjanova, I., A. Tóth, J. Pászti, et al. 2008. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSA’s? *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 978-985.
- 28) Adler, A., E. Solter, S. Masarwa, et al. 2013. Epidemiological and microbiological characteristics of an outbreak caused by OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Jerusalem. *J. Clin. Microbiol.* 51: 2926-2930.
- 29) Goren, M.G., I. Chmelnitsky, Y. Carmeli, et al. 2011. Plasmid-encoded OXA-48 carbapenemase in *Escherichia coli* from Israel. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 672-673.
- 30) Gülmez, D., N. Woodford, M.F. Palepou, et al. 2008. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31: 523-526.
- 31) Moquet, O., C. Bouchiat, A. Kinana, et al. 2011. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 143-144.
- 32) Poirel, L., S. Bernabeu, N. Fortineau, et al. 2011. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 4937-4938.
- 33) Morris, D., E. McGarry, M. Cotter, et al. 2012. Detection of OXA-48 carbapenemase in the pandemic clone *Escherichia coli* O25b: H4-ST131 in the course of investigation of an outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 4030-4031.
- 34) Beyrouthy, R., F. Robin, A. Cougnoux, et al. 2013. Chromosome-mediated OXA-48 carbapenemase in highly virulent *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68: 1558-1561.
- 35) Poirel, L., A. Ros, A. Carrër, et al. 2011. Cross-border transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 1181-1182.
- 36) Kalpoe, J.S., N. Al Naiemi, L. Poirel, et al. 2011. Detection of an Ambler class D OXA-48-type β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in The Netherlands. *J. Med. Microbiol.* 60: 677-678.
- 37) Adler, A., M. Shklyar, M.J. Schwaber, et al. 2011. Introduction of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* to Israeli hospitals by medical tourism. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 2763-2766.
- 38) Koh, T.H., D.Y. Cao, K.S. Chan, et al. 2012. bla_{OXA-181}-positive *Klebsiella pneumoniae*, Singapore. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 1524-1525.
- 39) van der Bij, A.K., J.D. Pitout. 2012. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 67: 2090-2100.
- 40) Castanheira, M., L.M. Deshpande, D. Mathai, et al. 2011. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: re-

- port from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006–2007. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 1274-1278.
- 41) Williamson, D.A., H. Heffernan, H. Sidjabat, et al. 2011. Intercontinental transfer of OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* into New Zealand. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 2888-2890.
- 42) Potron, A., P. Nordmann, E. Lafeuille, et al. 2011. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 4896-4899.
- 43) Poirel, L., A. Ros, A. Carricajo, et al. 2011. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 447-448.
- 44) Poirel, L., M. Castanheira, A. Carrer, et al. 2011. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 2546-2551.
- 45) Abdelaziz, M.O., C. Bonura, A. Aleo, et al. 2012. OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae* in Cairo, Egypt, in 2009 and 2010. *J. Clin. Microbiol.* 50: 2489-2491.
- 46) Cuzon, G., J. Ouanich, R. Gondret, et al. 2011. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 2420-2423.

Emergence of OXA-48 Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Japan

Noriyuki Nagano¹⁾²⁾³⁾, Yukiko Nagano²⁾, Yoshichika Arakawa³⁾

¹⁾Medical Microbiology Laboratory, Funabashi Municipal Medical Center, Chiba, Japan

²⁾Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

³⁾Department of Bacteriology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

Carbapenems including imipenem and meropenem play a critically important role as last report antimicrobials in treating severe bacterial infections. Therefore, widespread of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens belonging to the family *Enterobacteriaceae* (CRE) has been recognized as one of the newly emerging serious clinical problems. Here we describe CRE producing OXA-48-like carbapenemase, one of emerging carbapenemases like KPC- and NDM-1-types. Since the prototype OXA-48 carbapenemase was first identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolated in Turkey in 2001, OXA-48 producers are spreading rapidly among European countries. Spread of OXA-48 carbapenemase in United States and Canada has also been reported recently. In Japan, we previously alerted for the first identification of OXA-48-producing *K. pneumoniae* isolates Kp1 and Kp2, and *Escherichia coli* isolate Ec with slightly elevated carbapenem MICs from a patient, who had been hospitalized in a Southeast Asian country in November, 2012. Bacterial isolates that produce OXA-48 alone like our isolate Kp1, which are sometimes apparently susceptible to broad-spectrum cephalosporins remain difficult to be identified as OXA-48 producer in the routine microbiology test. However, resistance to piperacillin/tazobactam as well as positive results in the modified Hodge test might be useful in the early detection of OXA-48 carbapenemase-producing gram-negative microbes including Kp1. Influx of various resistant types of bacteria including CRE into hospitals is inevitable. Then early detection and infection control of such new emerging drug-resistant bacteria is needed to prevent their widespread dissemination in our country.