

[原 著]

2011年に臨床材料から分離したプラスミド性 AmpC β -lactamase 産生腸内細菌の調査

山崎勝利¹⁾・小松 方²⁾・福田砂織³⁾・豊川真弘⁴⁾・西 功⁴⁾・幸福知己⁵⁾
中井依砂子⁵⁾・戸田宏文⁶⁾・佐藤かおり⁶⁾・小野 保⁷⁾・西尾久明⁸⁾・末吉範行⁹⁾
木田兼以¹⁰⁾・折田 環¹¹⁾・中村竜也¹²⁾・直本拓己¹²⁾・木下承皓¹³⁾・和田恭直¹⁴⁾

- 1) 和歌山労災病院中央検査部
- 2) 天理医療大学医療学部臨床検査学科
- 3) 天理よろづ相談所病院臨床病理部
- 4) 大阪大学医学部附属病院臨床検査部
- 5) 住友病院診療技術部臨床技術科
- 6) 近畿大学医学部附属病院中央臨床検査部
- 7) 京都第二赤十字病院検査部
- 8) 滋賀県立成人病センター検査部
- 9) 社会保険滋賀病院検査部
- 10) 大津赤十字病院検査部
- 11) 宝塚市立病院中央検査室
- 12) 神戸大学医学部附属病院検査部
- 13) 神戸大学医学部附属病院医療技術部
- 14) 兵庫医科大学病院臨床検査部

(平成 25 年 6 月 11 日受付, 平成 25 年 7 月 26 日受理)

2011年4月から6月の間に、近畿地区6府県、15医療機関で分離された *Escherichia coli* 1,442株、*Klebsiella pneumoniae* 452株、*Klebsiella oxytoca* 171株、および *Proteus mirabilis* 106株、合計2,171株の臨床分離株を対象として、plasmid-mediated AmpC β -lactamase (PABL) 産生菌の調査を行った。Cefoxitinを用いた三次元拡散法とPCR法により、*E. coli* 26株と *P. mirabilis* 1株から CIT型遺伝子が、*E. coli* 3株と *K. pneumoniae* 1株から DHA型遺伝子が、*E. coli* 1株から MOX型遺伝子が検出され、合計32株(15%, 32/2,171)のPABL産生菌が検出された。分離された施設は、15施設中10施設であった。遺伝子型別ではCIT型が最も多く、次いでDHA型、MOX型の順であった。今回の調査でCIT型PABL酵素の蔓延が確認された。

Key words: plasmid-mediated AmpC β -lactamases, PCR, サーベイランス, rep-PCR

β -ラクタマーゼの産生は、グラム陰性桿菌における β -ラクタム系薬に対する耐性の主要な要因である¹⁾。

著者連絡先：(〒640-8505) 和歌山県和歌山市木ノ本 93-1
和歌山労災病院中央検査部
山崎勝利
TEL: 073-451-7172
FAX: 073-451-7172
E-mail: ktt-yamazaki@wakayamah.rofuku.
go.jp

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), metallo- β -lactamases (MBLs), およびプラスミド性 AmpC β -lactamases (plasmid-mediated AmpC β -lactamases, PABLs) などのプラスミド性酵素は、広域 β -ラクタム系薬を加水分解し、遺伝子が菌種を越えて拡散する可能性がある。したがって、これらの産生菌の検出は、疫学研究ならびに医療関連感染対策を行う上で重要である。

AmpC β -lactamases は、ペニシリン系薬とセファロスポリン系薬を加水分解する酵素であり、*Klebsiella*

spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii* 以外の *Citrobacter* spp., および *Proteus mirabilis* を除くほとんどのグラム陰性桿菌の染色体上には産生遺伝子である *ampC* が存在することが知られていた。つまり, AmpC β -lactamases は菌種固有の酵素であり, *ampC* は菌種を越えて伝達されることはないと考えられていた²⁾。しかし, 1989年に韓国において *Klebsiella pneumoniae* で CMY-1 型 PABL 酵素が最初に報告されて以来^{3,4)}, 世界中で PABL 酵素が報告されている⁵⁾。

PABL 遺伝子は, 染色体上に存在する *ampC* 遺伝子がプラスミドに転移したと考えられており, *Enterobacter* 属由来の ACT 型, *C. freundii* 由来の CIT 型, *Morganella morganii* 由来の DHA 型, *Hafnia alvei* 由来の ACC 型, および *Aeromonas* 属由来の MOX 型と FOX 型の 6 群に分類され, 最も優位で広く分布している酵素は CIT 型酵素である⁵⁾。

我々は過去の研究において近畿地区の PABL 産生菌の疫学データを報告したが⁶⁾, PABL 酵素の拡散を監視するために経年的にサーベイランスを行っている。今回 2011 年度の調査結果をとりまとめ以下に報告する。

1. 材料と方法

1. 対象株

2011年4月から6月までに, 近畿地区 15 医療機関 (大学病院 5 施設, 地域基幹病院 9 施設, 登録検査所 1 施設) において各種臨床材料から分離された *Escherichia coli* 1,442 株, *K. pneumoniae* 452 株, *Klebsiella oxytoca* 171 株, および *P. mirabilis* 106 株の 4 菌種, 合計 2,171 株を対象とした。菌種・施設別の収集株数を表 1 に示す。

2. β -ラクタマーゼの解析

Cefpodoxime (CPDX) の MIC が $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ を示した株をスクリーニングし, cefoxitin (CFX) ディスクを用いた三次元拡散法 (three-dimensional test, 3D)⁷⁾ により AmpC β -ラクタマーゼ産生菌を検出した。3D は, 被検菌株をトリプテケースソイブロスにて増菌さ

せ, 遠心集菌した菌液を 5 回の凍結融解により菌体を破壊して粗酵素液を調整した。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 標準ディスク拡散法⁸⁾に従い, ミューラーヒントン寒天培地平板 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) に *E. coli* ATCC 25922 を接種後, CFX ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を配置し, ディスク端から 5 mm の位置から外側にスリットを入れて粗酵素液 30 μL を分注した。35°C 一夜培養後, CFX の酵素分解により切れ込みと阻止円が交差した地点に発育増強を認めれば陽性と判定し (図 1 上), 阻止円に変化がなければ陰性と判定した (図 1 下)。さらに, AmpC β -ラクタマーゼ産生菌における ESBLs の同時産生性を検出することを目的として double disk synergy test (DDST)⁹⁾ を用いて検出した。すなわち, McFarland 0.5 に調整した被検菌液をミューラーヒントン寒天培地平板に接種後, 培地中央に clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC) ディスクを置き, 中央から 25 mm の間隔で ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), および cefepime (CFPM) ディスクを配置し, 35°C で 16 時間培養後, CVA/AMPC ディスク側に阻止帯の伸延が認められたものを, CVA による β -ラクタマーゼ活性の阻害効果により ESBL 産生菌と判定した。

また, CFX を用いた 3D 陽性株は, MBL を検出するために CFX ディスクの代わりに meropenem (MEPM) ディスクに置き換えて 3D を実施した。

3. PCR 法による β -ラクタマーゼ遺伝子の検出

CFX を用いた 3D 陽性株を MOX 型, CIT 型, DHA 型, ACC 型, ACT 型, および FOX 型を増幅するプライマーを用いて, マルチプレックス PCR 法¹⁰⁾ により PABL 遺伝子を検出した。PABL 遺伝子の陽性コントロールは, クレイトン大学医学部の Nancy D. Hanson 博士の厚意により分与を受けた。陰性コントロールには, 滅菌蒸留水を用いた。さらに, PABL 遺伝子陽性株で ESBL を産生する株について, TEM 型¹¹⁾, SHV 型¹¹⁾, CTX-M 型¹²⁾ を増幅するプライマーを用いて, PCR 法により ESBL 遺伝子を検出した。

表 1. 菌種・施設別の収集株数

菌種/施設名	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	Total
<i>E. coli</i>	119	187	59	76	131	116	120	98	101	57	16	49	60	223	30	1,442
<i>K. pneumoniae</i>	27	92	19	27	31	26	33	24	26	21	8	7	32	63	16	452
<i>K. oxytoca</i>	8	39	3	4	9	14	16	12	18	3	4	7	6	28	0	171
<i>P. mirabilis</i>	7	14	7	2	10	4	5	4	2	2	5	3	9	31	1	106
Total	161	332	88	109	181	160	174	138	147	83	33	66	107	345	47	2,171

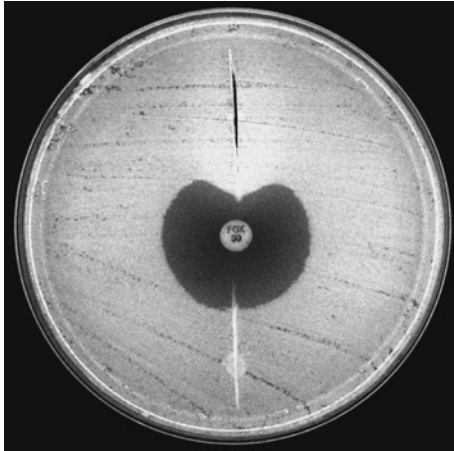


図1. CFX ディスクを用いた3D

上: CIT型 PABL 産生 *P. mirabilis* 株: 切れ込みと阻止円が交差した地点に、塗布した *E. coli* ATCC 25922 の発育増強を認める。

下: AmpC β-ラクタマーゼ非産生 *E. coli* 株: 塗布した *E. coli* ATCC 25922 の阻止円に変化はない。

MEPM を用いた 3D 陽性株は、IMP-1 型¹³⁾、IMP-2 型¹³⁾、VIM 型¹³⁾を増幅するプライマーを用いて、MBL 遺伝子を PCR 法により検出した。

4. rep-PCR 解析

PABL 遺伝子陽性株の菌種間の染色体遺伝子レベルでの相同性を確認するために、同一種を ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3')⁶⁾ プライマーを用いた repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR) 解析により比較した。染色体 DNA は、InstaGene DNA 精製マトリックス (BIO-RAD 社) を用いて精製した。バンドパターンが 2 バンド以上の違いを認めれば「由来が異なる菌株」であると判定した。

5. MIC 測定

PABL 遺伝子陽性株を、CLSI 標準微量液体希釈法¹⁴⁾ に従い、MicroScan Neg MIC 3.31E パネル (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社) と MicroScan Neg Combo 6.11B パネル (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社) を用いて、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。MIC 測定レンジは、piperacillin (8-64 μg/ml)、CTX (0.5-128 μg/ml)、CAZ (0.5-128 μg/ml)、CFPM (1-32 μg/ml)、CFX (2-32 μg/ml)、cefmetazole (0.5-32 μg/ml)、flomoxef (FMOX) (8-32 μg/ml)、CPDX (0.5-64 μg/ml)、MEPM (0.5-16 μg/ml)、amikacin (AMK) (4-32 μg/ml)、gentamicin (GM) (1-8 μg/ml)、minocycline

(MINO) (1-8 μg/ml)、levofloxacin (LVFX) (1-4 μg/ml)、および sulfamethoxazole/trimethoprim (ST) (38/2 μg/ml) であった。また、AMK、GM、MINO、LVFX、および ST を antibiogram に使用した。*E. coli* ATCC 25922 と *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 を精度管理に用い、精度管理基準は CLSI 微量液体希釈法¹⁵⁾ を使用した。

II. 結果

1. PABL 産生菌の分離頻度と遺伝子型

E. coli 1,442 株中 352 株 (24.4%)、*K. pneumoniae* 452 株 中 19 株 (4.2%)、*K. oxytoca* 171 株 中 38 株 (22.2%)、および *P. mirabilis* 106 株中 15 株 (14.2%) がスクリーニングされた。これら 424 株中、*E. coli* 83 株 (5.8%)、*K. pneumoniae* 2 株 (0.4%)、*K. oxytoca* 2 株 (1.2%)、および *P. mirabilis* 1 株 (0.9%) が、CFX を用いた 3D で陽性を示した。CFX を用いた 3D で陽性を示した 83 株中、*E. coli* 30 株 (2.1%)、*K. pneumoniae* 1 株 (0.2%)、および *P. mirabilis* 1 株 (0.9%) の合計 32 株 (1.5%) から PABL 遺伝子が検出された。遺伝子別では、CIT、DHA、および MOX 型の順で、27 株 (84.4%)、4 株 (12.5%)、および 1 株 (3.1%) から検出された。32 株の PABL 産生菌のうち、*E. coli* 5 株と *P. mirabilis* 1 株の合計 6 株が、DDST により ESBL 産生菌と判定された。

CFX を用いた 3D で陽性を示した 83 株中、*E. coli* 2 株、*K. pneumoniae* 1 株、*K. oxytoca* 2 株の合計 5 株が MEPM を用いた 3D で陽性を示し、IMP-1 型遺伝子が検出された。

2. PABL 産生株の特徴と臨床的背景の特徴

PABL 産生株の特徴と臨床背景を表 2 にまとめた。PABL 産生株が 15 施設中 10 施設から検出され、遺伝子別では、CIT 型が、*E. coli* 26 株 (4 府県・9 施設) と *P. mirabilis* 1 株から検出された。さらに、DHA 型が *E. coli* 3 株 (1 施設) と *K. pneumoniae* 1 株から、MOX 型が *E. coli* 1 株から検出された。

PABL 遺伝子陽性株のマルチプレックス PCR 法の結果を図 2 に示す。

9 施設から分離された CIT 遺伝子陽性 *E. coli* 26 株は、施設 B から分離された 4 株 (菌株 B-1、B-2、B-4、および B-5) を除き様々な antibiogram をもち、ERIC2 を用いた rep-PCR では 4 株 (菌株 B-2 と B-4、および B-3 と B-6) 以外は各々異なるパターンを示し (図 3)、2 株 (菌株 B-3 と B-6) は異なる antibiogram であった。一方、施設 N から分離された DHA 遺伝子陽性 *E. coli* 3 株 (菌株 N-1、N-3、および N-4) は同一 anti-

表2. PABL 産生株の特徴と臨床背景

菌種 (株数) と菌株番号	PABL type	rep-type	施設	府県	入院/外来	診療科・病棟	検査材料	分離日 (年/月/日)	Antibiogram ^a
<i>E. coli</i> (30)									
B-1	CIT	a	B	兵庫県	入院	血液内科・11E	尿	2011/4/5	MINO, LVFX, ST
B-2	CIT	b	B	兵庫県	入院	泌尿器科・8W	尿	2011/4/6	MINO, LVFX, ST
B-3	CIT	c	B	兵庫県	外来	小児科	尿	2011/4/19	
B-4	CIT	b	B	兵庫県	入院	下部消化器外科・11W	膿	2011/5/10	MINO, LVFX, ST
B-5	CIT	d	B	兵庫県	入院	下部消化器外科・11W	創部	2011/5/17	MINO, LVFX, ST
B-6	CIT	c	B	兵庫県	外来	泌尿器科	尿	2011/5/20	GM, MINO, ST
B-7	CIT	e	B	兵庫県	外来	皮膚科	膿	2011/6/1	ST
B-8	CIT	f	B	兵庫県	入院	下部消化器外科・11W	膿	2011/6/11	LVFX, ST
C-1	CIT	g	C	兵庫県	入院	外科・5W	膿	2011/5/2	MINO, ST
C-2	CIT	h	C	兵庫県	入院	消化器内科・8W	吸引痰	2011/5/12	GM, ST
C-3	CIT	i	C	兵庫県	入院	人工透析科・7W	尿	2011/5/13	GM, LVFX
C-4	CIT	j	C	兵庫県	入院	外科・5W	膿	2011/6/24	GM
F-1	CIT	k	F	京都府	外来	泌尿器科	尿	2011/5/25	
G-1	CIT	l	G	大阪府	入院	消化器内科・65	血液	2011/4/4	GM, MINO, LVFX
H-1	CIT	m	H	大阪府	入院	消化器・12N	血液	2011/6/3	GM, MINO, LVFX, ST
H-2	CIT	n	H	大阪府	外来	泌尿器科	尿	2011/6/16	
I-1	CIT	o	I	大阪府	入院	消化器外科・E4	尿	2011/5/13	ST
I-2	CIT	p	I	大阪府	入院	腎臓内科・E3	尿	2011/5/23	MINO, LVFX, ST
I-3	CIT	q	I	大阪府	入院	脳神経外科・W13	尿	2011/6/14	LVFX
J-1	CIT	r	J	大阪府	外来	内科	尿	2011/5/17	
J-2	CIT	s	J	大阪府	外来	泌尿器科	尿	2011/6/13	
L-1	CIT	t	L	滋賀県	入院	循環器内科・W3	尿	2011/4/4	
L-2	CIT	u	L	滋賀県	入院	外科・N5	ドレーン	2011/5/16	ST
L-3	CIT	v	L	滋賀県	入院	外科・ICU	膿	2011/5/16	LVFX, ST
L-4	CIT	w	L	滋賀県	入院	脳神経外科・N9	尿	2011/4/1	
N-2	CIT	x	N	滋賀県	外来	泌尿器科	尿	2011/4/26	MINO, LVFX
N-1	DHA	A	N	滋賀県	入院	小児科・4W	尿	2011/4/2	GM, ST
N-3	DHA	B	N	滋賀県	入院	婦人科・4E	膿分泌物	2011/5/18	GM, ST
N-4	DHA	B	N	滋賀県	入院	婦人科・4E	尿	2011/5/25	GM, ST
F-2	MOX	F	F	京都府	入院	小児科・C3S	膿	2011/4/6	GM
E-1	DHA	E	E	奈良県	入院	神経内科・白川	尿	2011/6/20	ST
G-2	CIT	G	G	大阪府	外来	泌尿器科	腎盂内膿汁	2011/5/24	MINO

^aAntibiogram: AMK, amikacin (64 μ g/ml); GM, gentamicin (16 μ g/ml); MINO, minocycline (16 μ g/ml); LVFX, levofloxacin (8 μ g/ml); ST, sulfamethoxazole/trimethoprim (76/4 μ g/ml).

biogramであったが、2株(菌株N-3およびN-4)のみが同一ERIC2-PCRパターンを示した(図3)。

3. PABL 産生株の抗菌薬感受性

標準菌株のMIC値は管理限界値内であった。表3にPABL産生株の β -ラクタマーゼ型と β -ラクタム系薬のMICを示した。32株のPABL産生株の感受性は、カルバペネム系薬のMEPMを除き様々であった。

DDSTで陽性を示した6株のPABL遺伝子陽性株

(菌株B-5, B-8, C-3, H-2, L-3, およびG-2)からCTX-M型ESBL遺伝子が検出され(図4), CFPMに対し耐性であった。

III. 考察

本研究では、PABL産生菌の表現型の検出法としてCFXを用いた3Dを用いた。*E. coli* 1,442株のうち、CFXを用いた3D陽性は83株(5.8%)であった。そのうち、30株がPABL産生菌であり、2株はMBL産

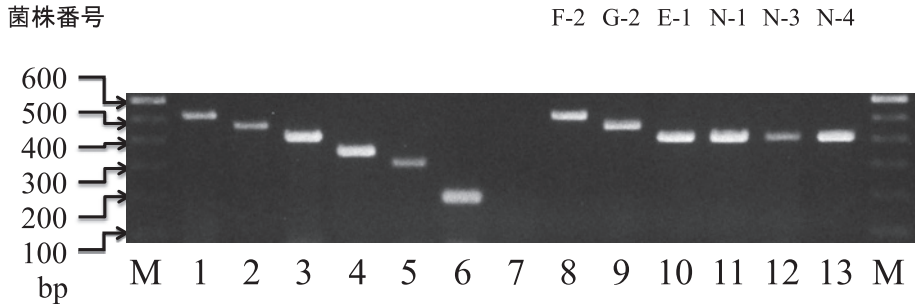


図2. Multiplex PCRの結果

レーン1～6: MOX, CIT, DHA, ACC, ACT, およびFOX遺伝子陽性コントロール, レーン7: 陰性コントロール, レーン8: MOX遺伝子陽性*E. coli*株, レーン9: CIT遺伝子陽性*P. mirabilis*株, レーン10: DHA遺伝子陽性*K. pneumoniae*株, レーン11～13: DHA遺伝子陽性*E. coli*3株, M: 100-bp DNA ladder.

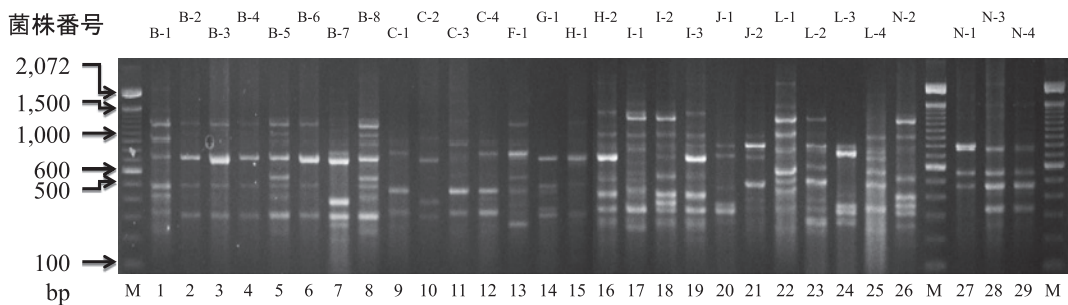


図3. CIT遺伝子陽性*E. coli*26株とDHA遺伝子陽性*E. coli*3株のERIC2-PCRパターン

レーン1～26: CIT遺伝子*E. coli*26株, レーン27～29: DHA遺伝子陽性*E. coli*3株, M: 100-bp ladder.

生菌と判定された。残りの51株は染色体性AmpCの過剰産生株であると考えられた。したがって、*E. coli*では表現型試験を用いてPABL産生株を検出するのは困難であると考えられた。一方、染色体性ampC遺伝子を欠く菌種である*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, および*P. mirabilis*において5株がCFXを用いた3D陽性であり、2株がPABL産生菌、残り3株はMBL産生菌であった。これらの菌種では、CFXとMEPMを用いることで表現型においてPABL産生株とMBL産生株を区別できると考えられた。

本研究期間におけるPABL産生菌の検出頻度は1.5% (2,171株中32株)であり、過去に実施した調査⁹⁾の0.19% (31,255株中59株)より増加しており ($p < 0.001$), PABL産生株が15施設中10施設から検出されたことは、近畿地区におけるPABL産生菌の増加と蔓延を示唆すると考えられた。

CIT型PABL酵素が、*E. coli*1,442株中26株(1.8%)および*P. mirabilis*106株中1株(0.9%)から検出さ

れた。近畿地区におけるCIT型酵素の拡散を示唆して、CIT型酵素が6府県中4府県、15施設中9施設から検出された。

9施設から分離された複数株のCIT型酵素産生*E. coli*は、施設Bから分離された2株以外は、各々の菌株が無関係であることを表現して異なるrep-PCRパターンあるいは異なるantibiogramを示した。この結果から、*E. coli*におけるCIT型酵素の拡散の原因は、耐性プラスミドの伝播による拡散であると考えられた。

施設Bから分離されたCIT型酵素産生*E. coli*2株は、antibiogramとrep-PCRパターンが同一であったが異なる診療科・異なる病棟から分離された。一方、施設Mから分離されたDHA型酵素産生*E. coli*2株は、同一診療科・同一病棟から分離されantibiogramとrep-PCRパターンが同一であり、施設内拡散の可能性が示唆された。

本研究において、AMK耐性のPABL産生菌は検

表3. PABL産生株の β -ラクタマーゼ型と β -ラクタム系薬のMIC

菌種(株数)と 菌株番号	β -ラクタマーゼ型	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a								
		PIPC	CTX	CAZ	CFPM	CFX	CMZ	FMOX	CPDX	MEPM
<i>E. coli</i> (30)										
B-1	CIT	>64	8	32	≤ 1	>32	16	32	>64	≤ 0.5
B-2	CIT	>64	8	16	≤ 1	>32	32	32	>64	≤ 0.5
B-3	CIT	>64	16	16	≤ 1	>32	8	32	>64	≤ 0.5
B-4	CIT	>64	16	16	≤ 1	>32	32	32	>64	≤ 0.5
B-5	CIT, CTX-M-like	>64	>128	32	>32	>32	32	32	>64	≤ 0.5
B-6	CIT	>64	1	2	≤ 1	4	4	≤ 8	32	≤ 0.5
B-7	CIT	>64	64	128	≤ 1	>32	>32	>32	>64	≤ 0.5
B-8	CIT, CTX-M-like	>64	64	2	16	16	4	≤ 8	>64	≤ 0.5
C-1	CIT	>64	8	16	≤ 1	>32	32	8	>64	≤ 0.5
C-2	CIT	>64	2	4	≤ 1	16	2	≤ 8	>64	≤ 0.5
C-3	CIT, CTX-M-like	>64	>128	>128	>32	32	16	32	>64	≤ 0.5
C-4	CIT	>64	8	16	≤ 1	32	8	32	>64	≤ 0.5
F-1	CIT	>64	4	8	≤ 1	>32	16	32	>64	≤ 0.5
G-1	CIT	16	8	16	≤ 1	>32	>32	32	>64	≤ 0.5
H-1	CIT	>64	16	128	≤ 1	>32	>32	>32	>64	≤ 0.5
H-2	CIT, CTX-M-like	>64	>128	8	>32	32	8	≤ 8	>64	≤ 0.5
I-1	CIT	>64	4	4	≤ 1	16	4	≤ 8	64	≤ 0.5
I-2	CIT	>64	1	8	≤ 1	16	8	≤ 8	64	≤ 0.5
I-3	CIT	>64	2	8	≤ 1	32	8	32	>64	≤ 0.5
J-1	CIT	>64	2	8	≤ 1	16	4	≤ 8	>64	≤ 0.5
J-2	CIT	>64	8	32	≤ 1	>32	16	32	>64	≤ 0.5
L-1	CIT	>64	8	8	≤ 1	16	8	≤ 8	>64	≤ 0.5
L-2	CIT	>64	8	32	≤ 1	>32	32	32	>64	≤ 0.5
L-3	CIT, CTX-M-like	>64	>128	64	>32	>32	>32	>32	>64	≤ 0.5
L-4	CIT	64	8	32	≤ 1	>32	32	32	>64	≤ 0.5
N-2	CIT	>64	8	32	≤ 1	>32	32	32	>64	≤ 0.5
N-1	DHA	>64	8	8	≤ 1	>32	32	32	64	≤ 0.5
N-3	DHA	>64	2	16	≤ 1	>32	16	32	32	≤ 0.5
N-4	DHA	16	1	8	≤ 1	8	2	≤ 8	8	≤ 0.5
F-2	MOX	>64	64	8	≤ 1	>32	32	≤ 8	>64	≤ 0.5
<i>K. pneumoniae</i> (1)										
E-1	DHA	>64	32	128	≤ 1	32	32	32	>64	≤ 0.5
<i>P. mirabilis</i> (1)										
G-2	CIT, CTX-M-like	>64	>128	1	>32	16	4	≤ 8	>64	≤ 0.5

^aPIPC, piperacillin ; CTX, cefotaxime ; CAZ, ceftazidime ; CFPM, cefepime ; CFX, ceftioxin ; CMZ, cefmetazole ; FMOX, flomoxef ; CPDX, cefpodoxime ; MEPM, meropenem.

出されなかったが, GM, MINO, LVFX, および ST に対して, 同順で 10 株 (31.3%), 11 株 (34.4%), 12 株 (37.5%), および 18 株 (56.3%) が耐性であり, PABL 産生菌による β -ラクタム系薬以外の耐性にも注意が必要である。

PABL 産生菌 32 株のうち CTX-M 型 ESBL 非産生

株 26 株 (81.2%) は, CFPM に対して感受性であったが, CTX-M 型 ESBL を共同産生する PABL 産生菌 6 株は耐性であり, ESBL と PABL 共同産生株には今後注目すべきである。したがって, PABL 産生株の治療薬として, セファロsporin 系薬を用いるのを避ける必要があると考えられた。

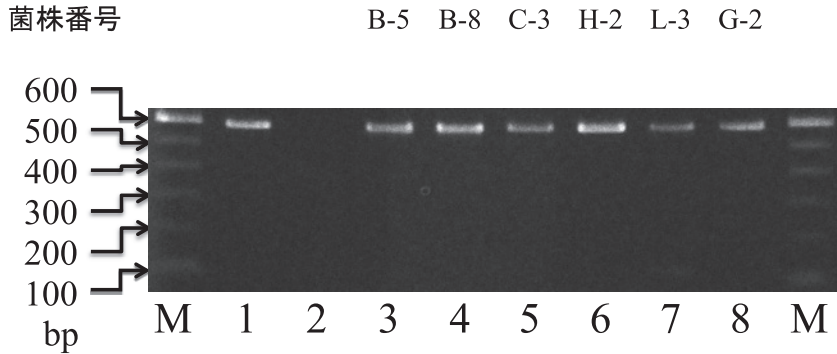


図4. CTX-M型ESBL共同産生CIT型PABL産生株のPCR結果

レーン1: CTX-M型ESBL遺伝子陽性コントロール, レーン2: 陰性コントロール, レーン3~7: CTX-M型ESBL遺伝子陽性CIT型PABL産生*E. coli* 5株, レーン8: CTX-M型ESBL遺伝子陽性CIT型PABL産生*P. mirabilis*株, M: 100-bp DNA ladder.

結果として、近畿地区における優位なPABL酵素はCIT型であり、以下DHA型、MOX型であった。台湾¹⁶⁾や中国¹⁷⁾ではCIT型とDHA型酵素が、韓国¹⁸⁾¹⁹⁾ではCIT型、DHA型、MOX型、およびACT-1型酵素が、米国²⁰⁾²¹⁾ではCIT型、DHA型、ACT型、およびFOX型酵素が検出されており、我々の過去の調査⁹⁾ではCIT型、DHA型、MOX型が検出され本研究と同様の結果であった。

本研究期間においてアウトブレイクによる検出例が無かったにもかかわらずPABL産生菌の検出率が過去に実施した調査⁶⁾より増加しており、さらに蔓延する危険性が危惧され継続した調査が必要と考える。

なお、本論文の要旨は第24回日本臨床微生物学会総会(2013年、横浜)において発表し、座長および編集委員推薦を受けたものである。

謝辞: 本研究は第15回近畿耐性菌研究会(和田恭直代表)の研究費により行われたものである。

利益相反: 特記すべきものはありません。

文 献

- Medeiros, A.A. 1997. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 24 (Suppl. 1): S19-S45.
- Walther-Rasmussen, J., N. Hoiby. 2002. Plasmid-borne AmpC β -lactamases. *Can. J. Microbiol.* 48: 479-493.
- Bauernfeind, A., Y. Chong, S. Schweighart. 1989. Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 17: 316-321.
- Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, et al. 1996. Comparative characterization of the cephamycinase *bla*_{CMY-1} gene and its relationship with other β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1926-1930.
- Philippon, A., G. Arlet, G.A. Jacoby. 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1-11.
- Yamasaki, K., M. Komatsu, N. Abe, et al. 2010. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the Kinki Region of Japan. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3267-3273.
- Coudron, P.E., E.S. Moland, K.S. Thomson. 2000. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1791-1796.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 9th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Jarlier, V., M.H. Nicolas, G. Fournier, et al. 1988. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10: 867-878.
- Pérez-Pérez, F.J., N.D. Hanson. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2153-2162.
- Arlet, G., A. Philippon. 1991. Construction by polym-

- erase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). FEMS Microbiol. Lett. 82: 19-26.
- 12) Pagani, L., E. Dell'Amico, R. Migliavacca, et al. 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. J. Clin. Microbiol. 41: 4264-4269.
 - 13) Nishio, H., M. Komatsu, N. Shibata, et al. 2004. Metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki Region of Japan. J. Clin. Microbiol. 42: 5256-5263.
 - 14) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4th ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
 - 15) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 18th informational supplement. CLSI document M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
 - 16) Yan, J.J., P.R. Hsueh, J.J. Lu, et al. 2006. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 1861-1864.
 - 17) Li, Y., Q. Li, Y. Du, et al. 2008. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-type AmpC β -lactamase resistance in China. J. Clin. Microbiol. 46: 1317-1321.
 - 18) Lee, K., M. Lee, J.H. Shin, et al. 2006. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. Microb. Drug Resist. 12: 44-49.
 - 19) Song, W., J.S. Kim, H.S. Kim, et al. 2006. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal *ampC* gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. Diagn. Microbiol. Infect. Disease. 16: 219-224.
 - 20) Alvarez, M., J.H. Tran, N. Chow, et al. 2004. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 533-537.
 - 21) Moland, E.S., J.A. Black, J. Ourada, et al. 2002. Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3837-3842.

EPIDEMIOLOGICAL STUDY FOR PLASMID-MEDIATED AmpC β -LACTAMASES
AMONG CLINICAL ISOLATES DURING APRIL AND JUNE 2011
IN THE KINKI REGION OF JAPAN

Katsutoshi Yamasaki¹⁾, Masaru Komatsu²⁾, Saori Fukuda³⁾, Masahiro Toyokawa⁴⁾, Isao Nishi⁴⁾,
Tomomi Kofuku⁵⁾, Isako Nakai⁵⁾, Hirofumi Toda⁶⁾, Kaori Satoh⁶⁾, Tamotsu Ono⁷⁾, Hisaaki Nishio⁸⁾,
Noriyuki Sueyoshi⁹⁾, Kaneyuki Kida¹⁰⁾, Tamaki Orita¹¹⁾, Tatsuya Nakamura¹²⁾,
Takumi Jikimoto¹²⁾, Shohiro Kinoshita¹³⁾, Yasunao Wada¹⁴⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Wakayama Rosai Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory Science, Tenri Health Care University

³⁾Department of Clinical Pathology, Tenri Hospital

⁴⁾Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital

⁵⁾Clinical Laboratory, Sumitomo Hospital

⁶⁾Division of Clinical Microbiology, Department of Medical Technology, Kinki University School of Medicine

⁷⁾Clinical Laboratory, Kyoto Second Red Cross Hospital

⁸⁾Department of Clinical Laboratory, Shiga Medical Center for Adults

⁹⁾Clinical Laboratory, Social Insurance Shiga Hospital

¹⁰⁾Clinical Laboratory, Japanese Red Cross Otsu Hospital

¹¹⁾Clinical Laboratory, Takarazuka Municipal Hospital

¹²⁾Clinical Laboratory, Kobe University Hospital

¹³⁾Medical Technology Support, Kobe University Hospital

¹⁴⁾Clinical Laboratory, Hyogo Medical University Hospital

To investigate the production of plasmid-mediated AmpC β -lactamases (PABLs), a total of 2,010 strains of 4 enterobacterial species such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, and *Proteus mirabilis* were collected during April and June 2011 from 15 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. PABLs were detected in 32 (1.5%) of 2,171 isolates by the three-dimensional test with cefoxitin-disk and PCR analysis. PABL-positive isolates were detected in isolates from 10 laboratories. Thirty of 1,442 (2.1%) *E. coli*, 1 of 452 (0.2%) *K. pneumoniae*, and 1 of 106 (1.0%) *P. mirabilis* isolates were positive for PABLs. Of these, 32 PABL-positive strains, 27 (84.4%), 4 (12.5%), and 1 (3.1%) isolates carried the genes for CIT, DHA, and MOX PABLs, respectively. Pattern analysis in repetitive-sequence-based PCR of polymorphic DNA revealed that the prevalence of CIT-producing *E. coli* strains was not due to epidemic strains except for 2 strains, and that 2 DHA-producing *E. coli* strains were identical, suggesting their clonal relatedness. In conclusion, the CIT PABLs were predominantly present. The present findings will provide significant information to assist in preventing the emergence and further spread of PABL-producing bacteria.