

ONE POINT MEMO No.205

臨床検査ひとくちメモ

Q

ESBL、メタロ- β -ラクタマーゼ、AmpC型 β -ラクタマーゼ過剰産生菌について、Double Disc Synergy Testなどの表現型解析法の意義と実用性について教えてください。また、これらが検出された際の報告の仕方について教えてください。

A

順天堂大学医学部附属順天堂医院 臨床検査部

中村文子

順天堂大学 臨床検査医学講座

近藤成美

はじめに

Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)、metallo beta-lactamase (MBL)、AmpC beta-lactamase (AmpC) は、いずれも β -ラクタム系薬を加水分解する酵素 (β -ラクタマーゼ) のひとつであり、日常検査で高頻度に検出される腸内細菌や *P. aeruginosa*、*Acinetobacter baumannii* などのグラム陰性桿菌に認められる。これらが近年問題視されている背景と、各々の検査法および報告の実際について解説する。

I. ESBL、MBL、AmpC の検査はなぜ必要か

1. 多くはプラスミド性

ESBL、MBL、AmpC 産生を支配する遺伝情報のほとんどはプラスミド上に認められており、菌株・菌種を超えて伝達される特性を持っている。このような耐性情報は施設内や環境内に拡散・伝播しやすいため、感染対策の上で検出の意義は高い。

2. 多剤耐性

主な耐性菌と薬剤感受性の特徴を表1に示した¹⁻³⁾。染色体性 β -ラクタマーゼに比べて、ESBLなどプラスミド性 β -ラクタマーゼ産生菌は、広範囲の β -ラクタム系薬に耐性を示すことがわかる。そのため、これらの耐性菌による感染症では、使用できる抗菌薬が制限されてしまう。

3. 検出法が不統一

ESBL、MBL、AmpC 産生菌は、たとえばMRSAやVREのように「特定の抗菌薬のブレイクポイントから」検出できるものではない。複数の薬剤感受性成績や酵素阻害試験などから総合的に判断されるため、検査法や細菌学に熟知することが必要である。耐性因子や β -ラクタマーゼの種類を特定するには、遺伝子解析を行わなければならない。簡便な検査法等が設定されていない現在、これら耐性菌の検出に施設間差が生じているのが実情ではないだろうか。

II. ESBL

1. 検査法

①CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)法

CLSI法によるESBL産生菌の検出法を表2(ディスク拡散法)および表3(微量液体希釈法)に示した⁴⁾。各々にスクリーニング法と確定検査法が設定されている。本法の対象となる菌種は*E. coli*、*K. pneumoniae*、*K. oxytoca*、*P. mirabilis*の4種に限定されている(*Salmonella*や*Shigella*、*Citrobacter koseri*に適用できる場合あり)。他の腸内細菌科やブドウ糖非発酵菌などは、元来一部のセフェム系薬耐性であるため、本法を使用することはできない。

CLSI法によるESBLの検出は、自動機器にも搭載されるなど、現在最も広く利用されている。本法の検出感度および特異度は94%以上であり、その信頼性は高い⁵⁾。スクリーニング法は、日常検査での薬剤感受性測定結果を用いることができるが、確認試験にはCAZやCTXにクラブラン酸を添加した別途試薬が必要である。確認試験用の市販品として、MicroScan (SIEMENS)やフェニックス(日本BD)などのESBL用パネル、E-test(日本ビオメリュー)の阻害試験用ストリップが発売されており、比較的容易に行うことができる。

②DDST (Double Disc Synergy Test : ダブルディスク法)

DDSTは、ESBLがクラブラン酸によって活性阻害される性質を利用したものである。本法はディスク拡散法の手技で簡便に実施できるため、MIC測定や自動機器を導入していない施設で活用される。DDSTによるESBLの検出法を図1に示した。中央のクラブラン酸(AMPC/CVA)によって酵素活性が阻害され、CAZまたはCTXとの間に阻止円の拡張が認められれば陽性である。本法の感度は79~97%、特異度94~100%⁵⁾で、CLSI法に比べて偽陰性が出現しやすいことが指摘されている。これは各薬剤とクラブラン酸ディスクの距離に起因し、両者の距離を20mmに変更すると解消されることがある。

③その他の方法

シカベータテスト(関東化学)のIおよびCVAを

使用し、前者が陰性(赤)、後者が陽性(黄色)の場合をESBL産生とする。また、ChromID ESBL(日本ビオメリュー)やCTX、CPDX等を添加したESBL検出用培地も登場している。これらの高い実用性は学会等で報告されているが、ESBLの確定は遺伝子検査によらなければならない。

2. 臨床への報告

ESBL産生菌と判定された際には、ペニシリン系薬、セフェム系薬、モノバクタム系薬はMIC値の大小にかかわらずすべて耐性とし、セファマイシン系薬、カルバペネム系薬は試験結果そのままを報告する。ESBL産生菌による感染症の治療は、現在のところカルバペネム系薬が推奨されている。

CLSIでは、2010年のdocument(M100-S20)で一部のセフェム系薬とカルバペネム系薬のブレイクポイントを改定した^{4,6,7)}。たとえば、CTX等の感性のMICが8 μ g/mlから1 μ g/mlへ、IPMとMEPMは4 μ g/mlから1 μ g/mlへなど、耐性域が広がっている。これに伴って、ESBLの報告のあり方も変更されている。すなわち、旧ブレイクポイントを使用した場合には、ESBL試験を実施して前述のごとく報告するが、新ブレイクポイント使用であれば、ESBL試験は不要、かつ薬剤感受性成績を変換することなくそのまま報告するとしている。新旧いずれを用いても、臨床へはESBL産生菌である旨を伝え、治療薬の適切な選択と感染対策に配慮する。

III. AmpC β -ラクタマーゼ

本邦でのAmpC産生菌は少ないものの、近年*Serratia marcescens*や*Enterobacter cloacae*、*Citrobacter freundii*などからも検出されており、今後の動向には注意が必要である^{8,9)}。

1. 検査法

①ボロン酸を用いたDDST⁹⁾

DDSTによるAmpCの検出法を図2に示した。本法は、ボロン酸化合物のひとつである3-aminophenylboronic acidがclass C β -ラクタマーゼ活性を阻害する性質を利用したものである。本法の有用性は高く、プラスミド性AmpC産生*E. coli*および*K. pneumoniae*はほぼ確実に検出できることが報告さ

表1 主なβ-ラクタマーゼと耐性パターン

産生酵素	Ambler の分類	Buch の分類	ペニシリン系 第1世代 セフェム 第2世代 セフェム 第3世代 セフェム 第4世代 セフェム モノバクタム系 セファマイシン系ほか									カルバペネム系				活性阻害	
			ABPC PIPC	CEZ	CTM	CTX CAZ	CPR CFPM	AZT CRMN	CMZ FMOX	IPM MEPM BIPM DRPM	CVA ²⁾	BA ³⁾	MPA ⁴⁾	EDTA			
ペニシリナーゼ (染色体性)	A	(2)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	-	-	-		
セファロスポリナーゼ (染色体性)	C	1	R	R	R(S)	S	S	S	S	S	S	-	+	-	-		
ESBL (プラスミド性)	A	2be	R	R	R	R(S)	R(I)	R	S	S	S	+	-	-	-		
AmpC 過剰産生型 (プラスミド性)	C	1	R	R	R	R(I)	R(I) ¹⁾	R(I)	R	S(I)	S(I)	-	+	-	-		
MBL (プラスミド性)	B	3	R	R	R	R	R	R(I)	R	R(S)	R(S)	-	-	+	+		
KPC 型 (プラスミド性)	A	2f	R	R	R	R(I)	R(I)	R	R	R(I)	R(I)	±	+	-	-		
OXA 型 (プラスミド性)	D	2d	R	R	R	R	R	R	R	R(I)	R(I)	±	-	-	-		

1) CFPM は感性 2) clavuronic acid 3) boronic acid 4) 2-mercaptopropionic acid または sodium mercaptoacetic acid

表2 CLSI document (M100-S20) による ESBL の検査法 (ディスク拡散法)

方法	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
使用培地	Mueller-Hinton agar	Mueller-Hinton agar
使用薬剤	CPDX (10μg), CAZ, AZT, CTX, CTRX (30μg) 含有ディスク	CPDX (10μg), CAZ, CTX (30μg) 含有ディスク
培養条件	35°C 16 ~ 18時間	35°C 16 ~ 18時間
判定	阻止円直径 (mm) が CPDX (≤17), CAZ (≤22), AZT (≤27), CTX (≤27), CTRX (≤25) のいずれかの条件を満たすとき ESBL を疑う	阻止円直径 (mm) が CPDX (≤22), CAZ (≤22), CTX (≤27) のいずれかの条件を満たすとき ESBL を疑う
使用培地	Mueller-Hinton agar	Mueller-Hinton agar
使用薬剤	CAZ 30μg, CAZ/CVA 30/10μg, CTX 30μg, CTX/CVA 30/10μg ディスク	CAZ 30μg, CAZ/CVA 30/10μg, CTX 30μg, CTX/CVA 30/11μg ディスク
培養条件	35°C 16 ~ 18時間	35°C 16 ~ 18時間
判定	単剤に比べ、併用で5mm以上阻止円が大きくなった場合をESBL	単剤に比べ、併用で5mm以上阻止円直径が大きくなった場合をESBL

表3 CLSI document (M100-S20) による ESBL の検査法 (微量液体希釈法)

方法	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
使用培地	二価イオン調整 Mueller-Hinton broth (CAMHB)	二価イオン調整 Mueller-Hinton broth (CAMHB)
使用薬剤	CPDX, CAZ, AZT, CTX, CTRX	CPDX, CAZ, CTX
培養条件	35°C 16 ~ 18時間	35°C 16 ~ 18時間
判定	CPDX (≥8μg/ml), CAZ・AZT・CTX・CTRX (≥2μg/ml) のいずれかの条件を満たすとき ESBL を疑う	CPDX, CAZ・CTX (≥2μg/ml) のいずれかの条件を満たすとき ESBL を疑う
使用培地	CAMHB	CAMHB
使用薬剤	CAZ と CAZ/CVA, CTX と CTX/CVA	CAZ と CAZ/CVA, CTX と CTX/CVA
培養条件	35°C 16 ~ 20時間	35°C 16 ~ 20時間
判定	単剤に比べ、併用で3管(8倍)以上低下した場合をESBL	単剤に比べ併用で3管(8倍)以上低下した場合をESBL

れている。ただし、本法は染色体性 AmpC 過剰産生株も陽性になるので、プラスミド性か否かの判別はできない。また、KPC 産生株（後述）も陽性となる。

本法の市販品にシカベータテストがある。シカベータ I および C を使用し、前者が陰性（赤）、後者が陽性（黄色）の場合を AmpC 産生とする。

② cefoxitin (CFX) を用いた 3 次元拡散法

CFX ディスクを用いた AmpC の検出法を 図 3 に示した。原法は Coudron の方法¹⁰⁾ であるが、被検菌から粗酵素を抽出する作業が伴うため、日常検査には導入しにくい。これを改良した方法を Noyal らが報告しているが¹¹⁾、本法の腸内細菌での評価は追試報告を待ちたい。

本法は、感度は良好であるものの特異性は高くなく、ESBL 産生菌も陽性となる。したがって、AmpC

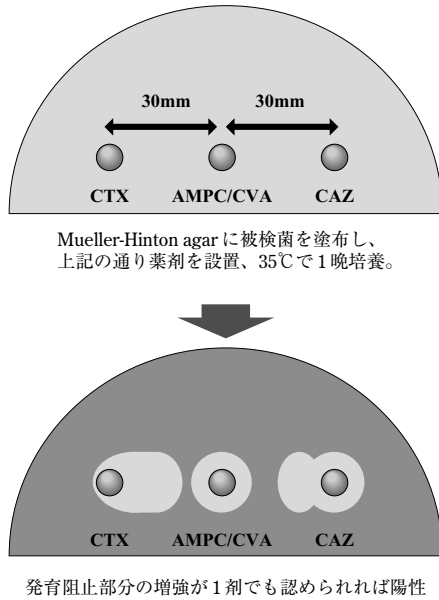


図 1 DDST による ESBL の検出

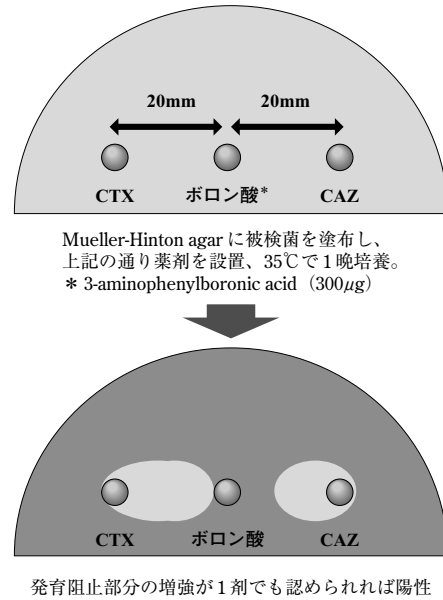
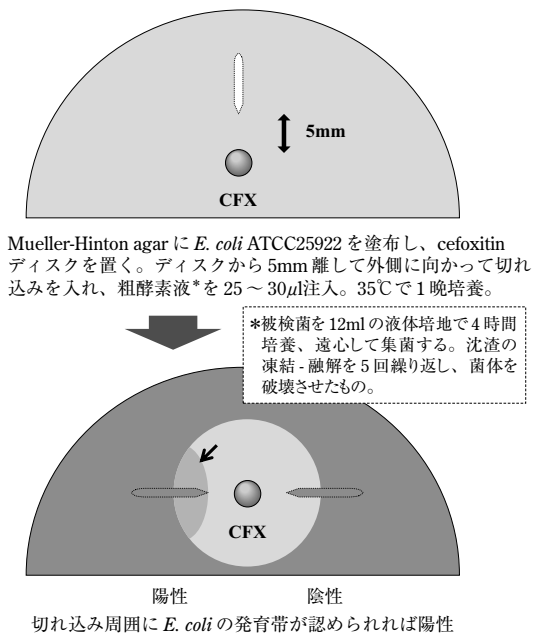
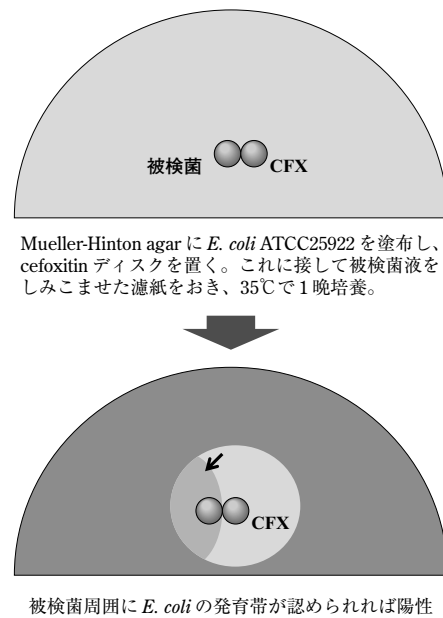


図 2 DDST による AmpC の検出



Coudron の方法



Noyal の変法

図 3 cefoxitin を用いた AmpC の検出

の判定は本法単独の結果で判断せず、ポロン酸試験やESBL検出試験等を併用して行う。

2. 臨床への報告

表1に示すごとく、AmpC産生菌はペニシリン系薬およびセフェム系薬に耐性である。これらが薬剤感受性検査で‘感性’と判定された場合でも、臨床的に無効である旨を報告する。これに対し、カルバペネム系薬は、AmpCの影響を受けず感性を保持しているため、多くの場合有効である。ただし、IPMなどのMICが若干高い株もあるので、本剤の検査成績はそのまま報告する。

IV. MBL

臨床上問題となるプラスミド性MBLは、さまざまな菌種で確認されている。当院では*P. aeruginosa*からの検出が最も多く、*E. cloacae*、*Pseudomonas putida*、*A. baumannii*がこれに続いている¹²⁾。そのほかごくまれではあるが、*C. freundii*、*Providencia rettgeri*、*S. marcescens*、*K. pneumoniae*や*E. coli*からも検出されている。

1. 検査法

①メルカプトプロピオン酸（メルカプト酢酸）を用いたDDST^{12,13)}

メルカプトプロピオン酸が、classB β -ラクタマーゼの亜鉛に結合して本酵素の活性を阻害する特性を利用したものである。検査の方法を図4に示した。阻害剤はメルカプトプロピオン酸（2-mercaptopropionic acid）を用いるのが原法であるが、本剤自身に抗菌活性があり阻止円を形成してしまうことから、メルカプト酢酸（sodium mercaptoacetic acid）3mg含有ディスクが利用しやすい。抗菌薬はIPM、CAZの2剤を使用する（一方のみ陽性を示す株がある）。メルカプト酢酸でのMBL検出感度はほぼ100%で、実用性、信頼性ともに高い。

市販品としてシカベータテストMBLがある。シカベータIおよびMBLを使用し、前者が陰性（赤）、後者が陽性（黄色）の場合をMBL産生とする。

②EDTAを用いたDDST^{14,15)}

EDTAもMBL活性阻害作用があり、上記の要領でIPMディスクとEDTA含有ディスクを用いて実

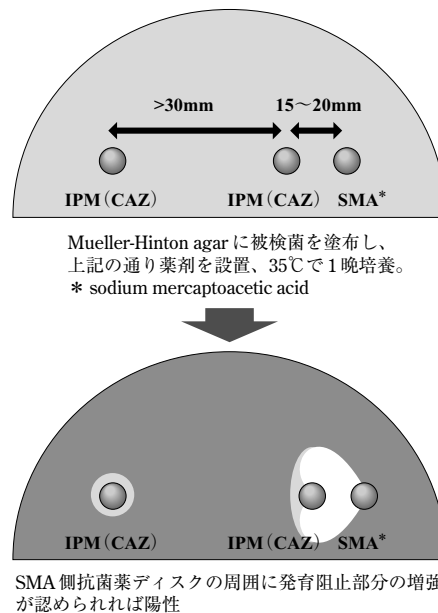


図4 DDSTによるMBLの検出

施する（図は省略）。E-test（日本ビオメリュー）の阻害試験用ストリップが発売されており、EDTA添加IPMのMICがIPM単剤より大きい場合MBL陽性と判断される。なお、本法はメルカプト酢酸法より若干感度が高いとの報告もあるが、おおむね変わらないと思われる。

検査上の注意点として、腸内細菌科のMBLはカルバペネム系薬に感性を示す場合もあるので、CAZ耐性をマーカーとしてDDSTを行うと検出漏れがない。

2. 臨床への報告

MBLは β -ラクタム系薬全般に作用するので、本酵素が確認された株のすべての β -ラクタム系薬は、MICいかににかかわらず耐性と報告する。MBL産生*P. aeruginosa*の多くはアミノグリコシド系薬やキノロン系薬などにも耐性を有していることが多く、有効抗菌薬がコリスチンなどに限定される。また、MBLはICUなどで流行しやすく、易感染患者に対する感染管理が重要である。そのためには、MBLを日常的に検査でき、MBL検出時は迅速に報告する体制が求められる。

V. MBL以外のカルバペネマーゼ

全 β -ラクタム系薬に耐性を獲得したMBL産生菌

は、本邦で最重要視されている耐性菌である。しかしながら、海外では MBL 以外のカルバペネマーゼ産生菌が台頭し、臨床の現場で問題となっている。本邦においても近年そのような耐性菌検出例が散見されており、今後の動向に注意が必要である。

1. *Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)*^{16~18)}

Class A に属するプラスミド性のカルバペネマーゼである。*K. pneumoniae* に最も多く認められるが、*E. coli*、*E. cloacae* などからも検出されている。KPC を保有する菌は全 β -ラクタム系薬に耐性を示し、加えて ESBL 産生能やアミノグリコシド系薬、キノロン系薬の耐性も同時に獲得していることが多い。KPC は、MBL と同等の監視体制を要する。

腸内細菌における KPC の検査法として、CLSI では MEPM を用いた modified Hodge test を推奨している (図 5)⁴⁾。本法は、1 つ以上の第 3 世代セフェム系薬に耐性を示し、かつカルバペネム系薬に I または R (新基準) を示す菌株について実施する。modified Hodge test 陽性の株はなんらかのカルバペネマーゼを産生していると判断される。KPC における感度および特異度は 90% 以上と良好であるが、MBL 等も陽性となるので、鑑別には前述の検査法を併用する。

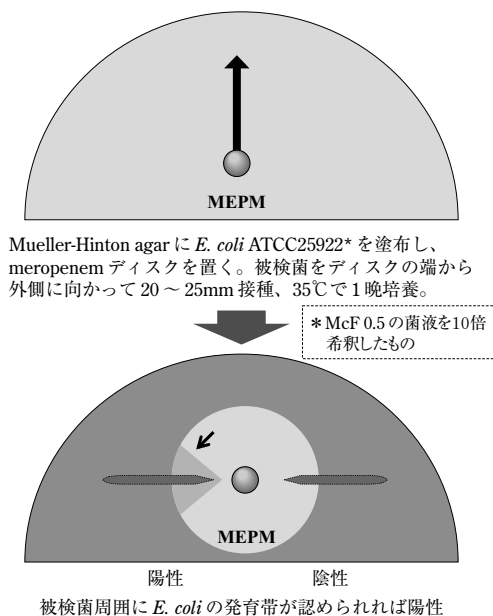


図 5 modified Hodge Test による carbapenemase の検出

2. OXA 型カルバペネマーゼ^{16,19)}

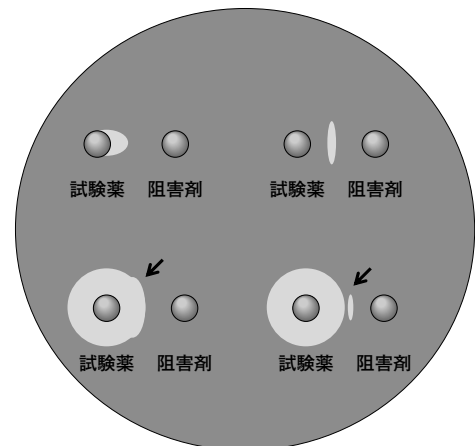
OXA 型 β ラクタマーゼは Class D に属し、現在 100 を超える type が報告されている。そのなかで、OXA-23、OXA-51、OXA-24、OXA-58 など保有する多剤耐性 *A. baumannii* が諸外国で確認されており、本邦でも近年問題となっている。OXA 型カルバペネマーゼは、クラブラン酸や EDTA による阻害試験では検出できず、modified Hodge test の有用性も確立されていない。本酵素の検出は、現在のところ遺伝子検査に頼らざるを得ない。

VI. 耐性菌を報告する上での注意点

1. 偽陰性/偽陽性はないか

DDST で出現する発育阻止像は一様ではない。図 6 に、DDST 判定の際に見逃されやすい陽性像を示した。阻止円が不明瞭であったり偽陰性が疑われる場合には、ディスク間隔を変えて再検するとよい。酵素の産生量が少ない場合も、時に偽陰性となる。

また、ESBL と AmpC、classC と MBL など複数の酵素を産生している株や、 β -ラクタマーゼによらない耐性機構 (外膜透過性の低下、薬剤排出機構の亢進など) を有している株では、正しい判定結果が得られないことがある。



左上：試験薬付近のわずかな非発育帯
 右上：試験薬と阻害剤の間のわずかな非発育帯
 左下：試験薬の阻止円に重なった非発育帯
 右下：試験薬の阻止円から離れたわずかな非発育帯

図 6 DDST で見逃されやすい陽性像

2. 感染症の起炎菌か

分離菌について、まず感染症の起炎菌か否かを確認する。耐性菌であっても、保菌や定着の場合には必ずしも抗菌薬治療は適切ではない。報告の際には菌量や塗抹所見など、感染症診断に役立つ情報も伝える。

おわりに

本邦における ESBL、AmpC、MBL 等の検出率は諸外国に比べて低率であるものの、増加傾向にある地域や施設内流行等の報告が散見されている。検査室は耐性菌の動向に留意し、感染対策に貢献する情報提供を心がけたい。

文 献

- 1) Bush K., Jacoby G. and Medeiros A.: A functional classification scheme for β -lactamase and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39** ; 1211-1233, 1995
- 2) 石井良和：基礎・臨床の両面から見た耐性菌の現状と対策－基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌. *モダンメディア* **53** ; 98-104, 2007
- 3) 中村文子：CLSI における ESBLs の検出法. *検査と技術* **35** ; 923-928, 2007
- 4) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th informational supplement M100-S20. 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 5) Ho P.L., Chow K.H., Yuen K.Y. *et al* : Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum β -lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother* **42** ; 49-54, 1998
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th informational supplement M100-S20-U (June 2010 update). 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 7) Clinical and Laboratory Standards Institute : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th informational supplement M100-S19. 2009. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 8) Jacoby G.A.: AmpC β -lactamase. *Clin. Microbiol. Rev.* **22** ; 161-182, 2009
- 9) Yagi T., Wachino J., Kurokawa H. *et al* : Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **43** ; 2551-2558, 2005
- 10) Coudron P.E., Moland E.S. and Thomson K.S.: Occurrence and detection of AmpC beta-lactamase among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans medical center. *J. Clin. Microbiol.* **38** ; 1791-1796, 2000
- 11) Noyal M., Menezes G., Sujatha H. *et al* : Simple screening test for detection of carbapenemase in clinical isolates of nonfermentative gram-negative bacteria. *Indian J. Med. Res.* **129** ; 707-712, 2009
- 12) 三澤成毅、小栗豊子、中村文子ほか：臨床材料からのメタロ- β -ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の検出状況と薬剤感受性. *日本化学療法学会誌* **55** ; 211-219, 2007
- 13) Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K. *et al* : Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* **38** ; 40-43, 2000
- 14) Lee K., Lim Y. S., Yong D. *et al* : Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp.. *J. Clin. Microbiol.* **41** ; 4623-4629, 2003
- 15) Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L. *et al* : Metallo- β -lactamase : the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* **18** ; 306-325, 2005
- 16) Queenan A.M. and Bush K.: Carbapenemase : the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20** ; 440-458, 2007
- 17) Anderson K.F., Lonsway D.R., Rasheed J.K. *et al* : Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **45** ; 2723-2725, 2007
- 18) Pateran F., Mendez T., Guerriero L. *et al* : Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **47** ; 1631-1639, 2009
- 19) Rasmussen J.W. and Hoiby N.: OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **57** ; 373-383, 2006