

【原著・基礎】

カルバペネム系薬耐性 *Pseudomonas putida* の分離状況とその遺伝子学的背景四方田幸恵¹・高橋 綾子¹・大久保豊司²・村上 正巳¹・伊豫部志津子²¹群馬大学医学部附属病院検査部*²同 薬剤耐性菌実験施設

(平成 14 年 10 月 8 日受付・平成 14 年 12 月 16 日受理)

1997 年 1 月から 2001 年 12 月までの 5 年間に群馬大学医学部附属病院検査部において臨床検査材料から分離した *Pseudomonas putida* は、患者の重複を除くと 83 株であった。このうち 27 株は imipenem (IPM) 耐性菌で、これらは IPM 感受性菌に比べ piperacillin, ceftazidime, amikacin, norfloxacin に対して有意に耐性率が高く、多くは多剤耐性であった。27 株の IPM 耐性菌のすべてが IMP 型メタロ-β-ラクタマーゼの遺伝子 (*bla_{IMP}*) を保有しており、多剤耐性 *P. putida* 株における *bla_{IMP}* の伝播が示唆された。この 27 株は 8 病棟から分離されていたが、そのうちもっとも多くの株が分離された病棟における患者由来株 (9 株) および病棟環境由来株 (4 株) について調べたところ、10 薬剤の MIC, パルスフィールドゲル電気泳動パターンから同一と思われる株が見出され、長期にわたる *P. putida* の院内定着が疑われた。さらにこれら 13 株のうち病棟環境由来株を含む 9 株の *bla_{IMP}* 遺伝子が *Pseudomonas aeruginosa* に接合伝達した。接合伝達株では、*bla_{IMP}* 遺伝子による β-ラクタム薬耐性に加えて、全株が amikacin 耐性を、また 4 株が gentamicin と tobramycin に対する耐性を同時に受け取っていた。これらの結果は、院内に定着する *P. putida* が *P. aeruginosa* に対する耐性遺伝子の供給原になりうることを示唆するものである。

Key words: *Pseudomonas putida*, カルバペネム系薬耐性, IMP 型メタロ-β-ラクタマーゼ, プラスミド

β-ラクタム系薬は臨床の場でもっとも使用頻度の高い抗菌薬である。この耐性機構としては、β-ラクタマーゼ産生が主要な耐性獲得機構であるが、特にメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌はほとんどのβ-ラクタム薬を加水分解するために、使用可能な薬剤が限られ、感染症の治療において問題となっている。したがってこの種の菌については院内感染対策上その分離状況を把握しておくことが重要と思われる。

われわれは、*Pseudomonas putida* について、過去 5 年間に当検査室に提出された検査材料からの分離状況を調査し、カルバペネム系薬耐性株における耐性遺伝子の検索と伝播の状況を調べたので報告する。

I. 材料と方法

1. 対象菌株

1997 年 1 月から 2001 年 12 月までの 5 年間に当検査室において臨床検査材料から分離した *P. putida* と、特に多くの株が分離された病棟についてはその環境から分離した *P. putida* も対象とした。

2. 薬剤感受性の測定

薬剤の MIC 測定は化学療法学会標準法¹⁾にしたがい、寒天平板希釈法にて行った。測定した薬剤は imipenem (IPM: 萬有製薬), meropenem (MEPM: 住友製薬), ceftazidime (CAZ: 日本グラクソ), cefepime (CFPM:

明治製薬), aztreonam (AZT: エーザイ), piperacillin (PIPC: 富山化学), gentamicin (GM: 塩野義製薬), tobramycin (TOB: 塩野義製薬), amikacin (AMK: 萬有製薬), norfloxacin (NFLX: 杏林製薬) である。

3. メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子についての検討

メタロ-β-ラクタマーゼの検出は SMA (栄研) によりスクリーニングを行い²⁾, PCR 法³⁾により遺伝子の確認を行った。耐性遺伝子の接合伝達実験は rifampicin (RIF) 耐性の *Pseudomonas aeruginosa* PAO 株 ML 5017 を受容菌としてメンブランフィルター法で行い³⁾, 伝達株は CAZ (8 μg/mL) と RIF (100 μg/mL) を含むニッスイ感受性測定寒天平板で選択した。

4. パルスフィールドゲル電気泳動

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) は、制限酵素 *Spe* I 処理を施したゲノム DNA を用いて、BIO-RAD 社製装置ジーンパスにて *P. aeruginosa* 用の泳動プログラムにしたがって行った⁴⁾。

II. 結果

1. カルバペネム系薬耐性菌の分離

1997 年 1 月から 2001 年 12 月までの 5 年間に臨床検査材料から分離された *P. putida* は患者の重複を除くと 83 株であった。これらの年次別入院外来別分離株数を

*群馬県前橋市昭和町 3-39-15

Table 1. Isolation number and frequency of *Pseudomonas putida* strains

Derived from	Year					Total (%)
	1997	1998	1999	2000	2001	
Inpatients	12	16	9	20	12	69 (83.1)
Outpatients	3	0	3	3	5	14 (16.9)
Total	15	16	12	23	17	83

Table 2. Source of *Pseudomonas putida* isolates

<i>P. putida</i> isolate (No.)	Source				
	urine	respiratory	digestive	others	total
Imipenem resistant strains	22	0	4	1	27
Imipenem susceptible strains	10	27	10	9	56
Total	32	27	14	10	83

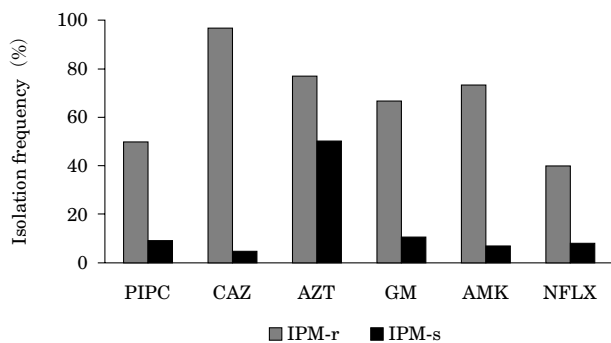
比較すると、年ごとの分離株数に顕著な増減の傾向は認められず、分離株の83.1% (69株) は入院患者由来であった (Table 1)。また由来材料別分離株数は、尿32株、呼吸器27株であり、両者で71%を占めた。

83株のうち27株がIPM耐性菌で、22株 (81%) は尿由来であり、呼吸器からの分離例はなかった (Table 2)。なお表には示さないが、*P. putida* の単独分離例は少なく、IPM耐性株の78%、感受性株の84%は他菌種との複数菌種分離例であった。

IPM耐性群と感受性群の他薬剤に対する耐性菌分離頻度をFig. 1に示した。その結果IPM耐性群はAZT以外のすべての薬剤、PIPC, CAZ, AMK, NFLXに対して有意に耐性率が高く、多くは多剤耐性であった。

なお各薬剤のブレイクポイントは、NCCLSの判定基準値を参考にして分離*P. putida* 83株のMIC分布図をもとに定め、MIC値 ($\mu\text{g/mL}$) がIMP \geq 16, CAZ \geq 32, AZT \geq 32, PIPC \geq 32, GM \geq 16, AMK \geq 16, NFLX \geq 16を耐性菌とした。

2. メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子の検出



PIPC: piperacillin, CAZ: ceftazidime, AZT: aztreonam, GM: gentamicin, AMK: amikacin, NFLX: norfloxacin, IPM: imipenem

Fig. 1. Isolation frequency of drug-resistant strains in imipenem (IPM)-resistant or IPM-susceptible *Pseudomonas putida* isolates.

27株のIPM耐性菌のすべてがSMA法とPCR法共に陽性であり、メタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla*_{IMP}) を保有するIMPタイプのメタロ- β -ラクタマーゼ産生株であった。

3. PFGEおよびMICパターンによる遺伝的背景の解析

これらの27株は8病棟から分離されていたが、このうち特に多くの株が分離された1病棟に注目して、患者由来の9株に病棟環境由来4株を加えた13株について、分離株の遺伝的背景を調べた。環境由来株は同時期に病棟の水周りから採取したものである。この病棟から分離された*P. putida*のPFGEパターンを、類似する株をならべてFig. 2に示した。株番号12と19の2株、1, 18, 20と29の4株、22と27の2株はパターンが完全に一致した。また、株番号17は1, 18, 20, 29との不一致は1断片のみであり、22と27の2株も1, 18,

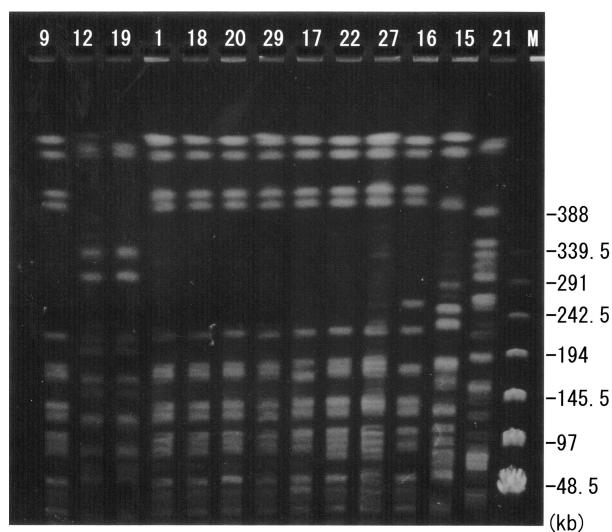


Fig. 2. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Pseudomonas putida* isolates derived from the same ward.

20, 29 と類似のパターンを示し、これらの7株は同一由来株と考えられた。

PFGE パターンの類似性に関連づけて、Table 3 にこれらの株の分離状況と10薬剤に対するMICパターンを示した。分離された全13株は調べた β -ラクタム薬とAMKに耐性を示し、このうち10株はGMとTOBにも耐性であり、さらに8株はNFLXにも耐性の多剤耐性菌であった。同一のPFGEパターンを示した株はMICパターンも一致しており、これらは同一の株であると結論された。また同一株は、患者と環境の両方から検出されており、特に多剤耐性株の1, 18, 20, 29のタイプは、患者、環境においてほぼ5年間にわたり病棟内に定着していた。

4. bla_{IMP} 遺伝子の接合伝達

同一病棟由来 *P. putida* 13株のうち9株から *P. aeruginosa* へ CAZ 耐性の接合伝達がみられた。伝達頻度は供与菌 *P. putida* 株あたり約 10^{-3} であり、伝達株す

べてからPCR法により bla_{IMP} 遺伝子が検出された。また伝達株 *P. aeruginosa* のMICパターンをみると、AMK耐性がすべての株から、またGMとTOB耐性が4株から、 bla_{IMP} 遺伝子と同時に伝達していた (Table 4)。伝達株の耐性パターンからは、2種類のプラスミドを介しての耐性伝達が推定される。これらが一病棟の *P. putida* 間で水平伝播し、さらに複数菌感染状況下で *P. aeruginosa* への耐性遺伝子の供給原になりうることを示唆している。

III. 考 察

臨床由来菌におけるメタロ- β -ラクタマーゼ産生株は、1991年に *P. aeruginosa*⁵⁾ についての報告がなされて以来、抗生剤の使用状況とあいまったわが国における特徴的な問題として捉えられ、*Serratia marcescens*^{3,6,7)} などの腸内細菌や *Acinetobacter baumannii*⁸⁾, *Alcaligenes xylosoxidans*⁹⁾ など多くの菌種についての報告が続いている。これらの酵素はいずれもIMP型メタロ- β -ラク

Table 3. Resistance patterns of strains derived from the same ward

<i>P. putida</i> strain		Source	MIC ($\mu\text{g/mL}$)									
strain no.	isolation date		IPM	MEPM	CAZ	CFPM	AZT	PIPC	GM	TOB	AMK	NFLX
9	1998.08	urine	64	>128	>128	128	32	16	2	0.5	>128	1
12	1999.06	urine	128	>128	>128	64	32	16	2	0.5	128	1
19	2000.04	environment	64	>128	>128	128	32	16	2	0.5	64	1
1	1997.03	urine	32	>128	>128	64	32	32	64	32	32	128
18	2000.04	environment	64	>128	>128	64	32	16	64	64	64	128
20	2000.04	environment	64	>128	>128	64	32	32	128	128	128	128
29	2001.08	urine	64	>128	>128	64	64	32	128	128	64	>128
17	2000.04	urine	>128	>128	>128	>128	64	64	128	64	>128	128
22	2000.07	urine	128	>128	>128	>128	64	32	128	64	>128	128
27	2000.12	urine	128	>128	>128	>128	64	32	128	64	>128	128
16	2000.03	urine	128	>128	>128	>128	32	64	128	64	128	128
15	1999.12	urine	16	>128	>128	>128	32	>128	64	64	128	4
21	2000.04	environment	64	>128	>128	128	32	16	64	32	128	1

IPM: imipenem, MEPM: meropenem, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, AZT: aztreonam, PIPC: piperacillin, GM: gentamicin, TOB: tobramycin, AMK: amikacin, NFLX: norfloxacin

Table 4. Resistance patterns conferred by bla_{IMP} -bearing plasmids

Transconjugant derived from	MIC ($\mu\text{g/mL}$)									
	IPM	MEPM	CAZ	CFPM	AZT	PIPC	GM	TOB	AMK	
No. 9	4	32	128	64	2	8	<0.5	<0.5	64	
No. 12	4	32	128	128	2	4	<0.5	<0.5	64	
No. 19	4	32	128	64	2	4	<0.5	<0.5	64	
No. 29	4	32	128	64	2	4	4	16	128	
No. 17	4	32	128	64	2	4	<0.5	<0.5	128	
No. 22	4	32	128	64	2	4	4	16	32	
No. 27	4	32	128	64	2	4	4	16	64	
No. 15	4	32	128	64	2	4	<0.5	<0.5	128	
No. 21	4	32	128	64	2	4	4	16	32	
ML 5017*	<0.5	<0.5	<0.5	1	2	1	<0.5	<0.5	2	

*Host strain of transconjugants

IPM: imipenem, MEPM: meropenem, CAZ: ceftazidime, CFPM: cefepime, AZT: aztreonam, PIPC: piperacillin, GM: gentamicin, TOB: tobramycin, AMK: amikacin

タマーゼである。*P. putida* については VIM 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株が海外で報告されたが¹⁰⁾、IMP 型メタロ-β-ラクタマーゼについての詳細な検討はなされていない。

今回過去5年間にわたって当検査室で分離した *P. putida* を調査したところ、分離株の33%がIPM耐性であった。これらIPM耐性株の多くは多剤耐性菌であり、その全株がIMP型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株であった。当検査室における調査では、IPM耐性株のうちメタロ-β-ラクタマーゼ産生株の占める頻度は *P. aeruginosa* では6.5%¹¹⁾、*A. baumannii* では47.4%⁸⁾であった。しかし *P. putida* においてはIPM耐性菌の全株がメタロ-β-ラクタマーゼを産生しており、調べた限りにおいては、*Stenotrophomonas maltophilia*¹²⁾、*Chryseobacterium* spp.¹³⁾のような染色体性メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌種を除いてはこのような報告は認められなかった。

P. putida は、BERGEYS MANUAL で *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* と共に saprophytic or opportunistic animal pathogens¹⁴⁾として扱われている菌種であり、IPM耐性株の全株がIMP型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株であったことは重要な問題である。さらにこのメタロ-β-ラクタマーゼ産生遺伝子がアミノ配糖体耐性遺伝子を伴って高頻度に *P. aeruginosa* に伝達することは、*P. aeruginosa* の多剤耐性化にも関与している可能性が高い。

P. putida は *P. aeruginosa* と同様に環境棲息菌であるといわれている。今回の調査でも、多くのメタロ-β-ラクタマーゼ産生株が分離された病棟環境から患者由来株と同一の株が分離された。また同一株が長期にわたって院内に定着し、期間をあけて検査材料から分離されていることから、これらの菌は患者から患者への伝播だけではなく、病棟環境を介して伝播し、時に患者から分離されていると考えられる。

P. putida の多くが他菌種との複数菌分離例であることを考慮すると、プラスミド性メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *P. putida* の院内定着とその伝播は、多くの compromised host を抱える今日の病院においては、重要な問題であると思われる。

メタロ-β-ラクタマーゼのなかでもIMPタイプはわが国において多くの菌種から検出されており、感染症の治療上重要な位置にある。さらにその耐性遺伝子がプラスミド性である場合は、拡散の速度や菌種を超えた伝播などの問題も加わり、院内感染対策上監視を強化すべき対象となることは異論のないところであろう。

文 献

- 1) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法

- 改正について (1968年制定, 1974年改定)。Chemo-therapy 29: 76~79, 1981
- 2) 柴田尚宏, 土井洋平, 荒川宣親: メタロ-β-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌。臨床検査 45: 840~850, 2001
- 3) 角田光子, 佐竹幸子, 伊豫部志津子: 腸内細菌科菌種におけるメタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の検出。日化療会誌 47: 147~151, 1999
- 4) Yamashita M, Hida Y, Suzuki S, et al.: Genetic Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* by Pulsed Field Gel Electrophoresis. 感染症学雑誌 71: 607~613, 1997
- 5) Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al.: Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 35: 147~151, 1991
- 6) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, et al.: Molecular characterization of an enterobacterial metallo-β-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother 38: 71~78, 1994
- 7) Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, et al.: Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-β-lactamase gene *bla*_{IMP}. Antimicrob Agents Chemother 42: 2006~2011, 1998
- 8) Takahashi A, Yomoda S, Iyobe S, et al.: Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. J. Clin. Microbiol. 38: 526~529, 2000
- 9) Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, et al.: Detection of a variant metallo-β-Lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. Antimicrob Agents Chemother 46: 2014~2016, 2002
- 10) Lee K, Lim J B, Yum J H, et al.: *bla* (VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother 46: 1053~1058, 2002
- 11) 伊豫部志津子: カルバペネム系薬耐性菌出現の現状と背景。第36回緑膿菌感染症研究会講演記録: 3~6, 2002
- 12) Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, et al.: Purification and properties of inducible penicillin β-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 22: 564~570, 1982
- 13) Bellais S, Aubert D, Naas T, et al.: Molecular and biochemical heterogeneity of class B carbapenem-hydrolyzing β-lactamases in *Chryseobacterium meningosepticum*. Antimicrob Agents Chemother 44: 1878~1886, 2000
- 14) Palleroni N J: Genus I. *Pseudomonas* Migula 1984. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 1 (Krieg N R, Holt J G, ed.), p. 141~199, Williams & Wilkins, Baltimore, 1984

Isolation of carbapenem-resistant *Pseudomonas putida* and its genetic background

Sachie Yomoda¹⁾, Ayako Takahashi¹⁾, Toyoji Okubo²⁾,
Masami Murakami¹⁾ and Shizuko Iyobe²⁾

¹⁾Department of Laboratory Medicine and Clinical Laboratory Center, ²⁾Laboratory of Drug Resistance in
Bacteria Gunma University School of Medicine, 3-39-15 Showa-machi, Maebashi, Japan

We isolated 83 *Pseudomonas putida* strains in the 5 years from January 1997 through December 2001 at Gunma University Hospital. The sample was free of patient duplication. Among them, 27 isolates were resistant to imipenem (IPM), 22 of which were of urine origin. None was isolated from respiratory specimens. Most IPM-resistant isolates were strains multiply resistant to piperacillin, ceftazidime, amikacin, and norfloxacin. The IMP metallo- β -lactamase gene (*bla*_{IMP}) was identified by PCR from all 27 IPM-resistant strains, which were derived from different 8 wards. We focused on 13 *bla*_{IMP}-bearing *P. putida* strains of a ward, 9 isolated from inpatients and 4 detected from around the water pipe. The long-term residence of *bla*_{IMP}-bearing *P. putida* strains, identified as the same strains with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns and MIC patterns as for 10 drugs, was observed in both inpatients and the ward environment. From 9 of the 13 strains, the *bla*_{IMP} gene was effectively transferred to a recipient strain of *Pseudomonas aeruginosa*, conferring resistance to IPM and other β -lactams concomitantly with amikacin resistance; 4 of the 9 strains conferred additional resistance to gentamicin and tobramycin.