

【総説】

新規カルバペネム系薬耐性因子，ニュー・デリー型メタロβラクタマーゼ（NDM-1）の特徴

石井良和

東邦大学医学部微生物・感染症学講座*

(平成22年9月13日受付・平成22年9月21日受理)

2009年にYongらが、NDM-1 (New Delhi metallo-beta-lactamase-1) と命名した新規メタロβラクタマーゼ (metallo-β-lactamase: MBL) について報告した。その後、NDM-1を産生する多剤耐性大腸菌あるいは肺炎桿菌は、米国や英国などで分離されたことから注意喚起が促されている。NDM-1は、他のMBLと同じようにモノバクタム系薬を除く多くのβラクタム系薬を分解する。*bla_{NDM-1}*の特徴は、インド、バングラデシュ、パキスタンから帰国した人由来の腸内細菌科に属する大腸菌や肺炎桿菌から検出されることである。本邦でも栃木県の大学病院から本酵素産生大腸菌が埼玉県では本酵素産生肺炎桿菌がそれぞれ分離された。しかし、これまでにNDM-1産生菌に対する疫学調査や本酵素に関する基礎検討も十分になされているとは言えない。本稿では、現時点におけるNDM-1産生菌および*bla_{NDM-1}*の特徴について解説し、検出に際しての留意点についても言及してみたい。

Key words: β-lactamase, carbapenemase, NDM-1

これまでに900種類を超えるβラクタマーゼが発見されてきた¹⁾。初めてβラクタマーゼが発見されたのは、1940年のことであった。すなわち、βラクタム系薬の臨床使用が始まる以前に、すでに耐性菌が存在していたことになる。このことから、耐性菌は抗菌薬の使用とは無関係に存在することが理解できる。また、ヒト以外の動物や動物由来食材から耐性菌が検出されたり、健康人が耐性菌を保菌するとの報告もある²⁾。したがって、抗菌薬の使用とは無関係に耐性菌が存在していることは明らかである。しかし、耐性菌の蔓延・拡散には抗菌薬の使用が関係していることは事実である。

本稿では、現在までに得られたNew Delhi metallo-β-lactamase-1 (NDM-1)の産生菌に関する情報を整理して解説するとともに、NDM-1産生菌を検出する際の留意点についても述べてみたい。

I. メタロβラクタマーゼの特徴

メタロβラクタマーゼ (MBL) は、染色体上にその遺伝子が存在する菌種に特異的な (内因性) 酵素と主にプラスミド上にその遺伝子が存在する獲得型 (外来性) 酵素の2種類が存在する。前者の代表的な酵素として *Stenotrophomonas maltophilia* のカルバペネム系薬耐性に関与するL1と呼ばれている酵素が挙げられる。一方、後者に属する酵素は、現在までに7つのグループが報告されている。すなわち、IMP-型、VIM-型、SIM-型、GIM-型、SPM-型、KHM-型およびNDM-型酵素である。これらの酵素をコードする遺伝子は、元来グラム陰性菌の染色体上には存在せず、プラスミドなどの外来性遺伝因子

の獲得によって供給される^{1,3)}。また、プラスミド性MBL産生株は、単にカルバペネム系薬に耐性を示すのみならず、同時にアミノ配糖体系薬などの他系統の抗菌薬に耐性を示すことが多い。その理由として、これらのMBLをコードする遺伝子がインテグロン構造と呼ばれる特殊な遺伝子構造中に存在することが挙げられる。インテグロン構造は、薬剤耐性遺伝子を効率よく1カ所に集積する働きを有しており、集積された耐性遺伝子の一つとしてMBLをコードする遺伝子がある⁴⁾。

II. *bla_{NDM-1}*を保有する菌種 (属) と *bla_{NDM-1}*陽性菌の検出国

NDM-1産生肺炎桿菌は、Yongらによって報告されたが、スウェーデン在住のインド人がインドで医療行為を受けて帰国した後に創部から基質特異性拡張型βラクタマーゼ (Extended-spectrum β-lactamase: ESBL) 産生大腸菌およびカルバペネム感性 *Acinetobacter* 属菌とともに分離された⁵⁾。患者はニューデリー滞在中にアモキシシリン、アモキシシリン-クラブラン酸、メトロニダゾール、アミカシンおよびガチフロキサシンを非経口的に投与されていた。さらに、オーストラリアでは、バングラデシュで肺炎治療を受けた患者の尿から *bla_{NDM-1}* 保有大腸菌が分離されている。現在までに上述の例を含めて、インド、バングラデシュ、パキスタン、イギリス、アメリカ、スウェーデン、オランダ、ベルギー、オーストラリアなどで *bla_{NDM-1}* を保有する菌株が分離されている⁵⁻⁹⁾。本邦では獨協医科大学病院で昨年8月にカルバペネム系

薬耐性大腸菌が血液から分離されていたが、当時は詳細を調べる術がなくそのまま保存されていた。同患者はインドで医療行為を受けて帰国した患者であったことから、8月18日付の厚生労働省からの事務連絡にしたがって、PCR法により保存株の遺伝子検査を試みたところ *bla_{NDM-1}* が陽性となったので、同病院はこの事実を公表した。この患者はすでに快復して退院しており、その後同耐性菌は分離されていない。また、院内の他の患者への感染拡大もみられていない。埼玉県内の病院に入院している90代の女性からも同遺伝子を保有する肺炎桿菌が分離された。この女性は海外渡航歴もなく、市中でこの耐性菌が拡散している可能性が否定できないと考えられる。

NDM-1が他のプラスミド性MBLと異なる点として、MBLをコードする遺伝子は主としてブドウ糖非発酵菌から検出されたのに対して、本MBLをコードする遺伝子は腸内細菌科細菌から検出されることが挙げられる。*bla_{NDM-1}*は、肺炎桿菌や大腸菌の他にもエンテロバクター、シトロバクター、プロテウスなど、他の腸内細菌科に属する細菌からも検出されている⁷⁾。

III. 多剤耐性獲得機構

Yongらは、*bla_{NDM-1}*は、*bla_{IMP}*や*bla_{VTM}*などとは異なり、インテグロン構造中に存在しなかったことを示している⁵⁾。しかし、アミノ配糖体系薬アデニル酵素、リファンピシン耐性に関与するADP-リボシルトランスフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、エリスロマイシンアセチル化酵素という4種類の耐性因子を保持するクラス1インテグロンに隣接していたと述べている。さらに、同菌株は*bla_{CMY-4}*も保有しており、これら複数の耐性因子を保有することで多剤耐性を示したと考えられる。

一方、Poirelらは、オーストラリアで分離されたNDM-1産生大腸菌を用いて*bla_{NDM-1}*周辺の遺伝子構造を詳細に解析した⁹⁾。その結果、Yongらが報告した遺伝子構造の一部が確認されたが、*bla_{NDM-1}*はISEc33という挿入配列の下流に位置していることおよびISSen4の上流に存在したことが明らかとなった。ISSen4は、Yongらの分離株の*bla_{NDM-1}*周辺には認められず、スウェーデンで分離された肺炎桿菌とオーストラリアで分離された大腸菌では、保有する*bla_{NDM-1}*の出現過程が異なる可能性が示唆されている。さらに、オーストラリア株が保有する耐性遺伝子をPCRで確認したところ、*bla_{NDM-1}*以外にも*bla_{CTX-M-15}*および*bla_{TEM-1}*といったβラクタマーゼ遺伝子や*armA*および*rmtB*といったアミノ配糖体系薬に高度耐性を付与する16S rRNAメチラーゼ遺伝子も保有していた。さらにこの菌株は複数のプラスミドを保有しており、*bla_{CTX-M-15}*、*rmtB*および*bla_{TEM-1}*、*bla_{NDM-1}*はそれぞれ異なるプラスミド上に存在したと述べている。オーストラリア株とスウェーデン株から検出された耐性因子の種類には違いが

あるが、複数の耐性因子が一菌株に集積された結果、多剤耐性化したことが理解できる。

IV. *bla_{NDM-1}*をコードする遺伝子を保有するプラスミドの特徴

Kumarasamyらは、インドで分離された肺炎桿菌の*bla_{NDM-1}*はプラスミド上に存在していたのに対して、英国株中の3株は染色体上に*bla_{NDM-1}*が存在していたと述べている⁷⁾。また、これらの菌株が保有するプラスミドは均一なものではなく、インド株では50 kbから350 kb、英国株では80 kbから500 kb以上と非常に変化に富んでいた。また、インドのChennaiで分離された*bla_{NDM-1}*保有33株中13株で不和合性A/C型のプラスミド上に*bla_{NDM-1}*が存在していた。また、英国で保存されていた菌株から無作為に抽出された32株のうち22株の*bla_{NDM-1}*がA/C型のプラスミド上に存在した。残念ながら、Haryanaで分離された14株のプラスミドの不和合性型は決定できなかった。著者らは33株のChennaiで分離された菌株と32株の英国分離株を用いて、カルバペネム系薬感性大腸菌への耐性因子の伝達を試みたところ接合伝達株が得られたが、Haryanaで分離された22株の肺炎桿菌では耐性因子の伝達は成功しなかったと述べている。一方、英国で分離されていた菌株では耐性因子が大腸菌に伝達され、得られたすべての接合伝達体から*bla_{NDM-1}*が検出された。しかし、10%の菌株において伝達されたプラスミドのサイズが変化していたと述べている。

V. 医療現場における耐性菌の検出方法

医療現場において重要なことは耐性菌を検出することではなく、治療に有用な抗菌薬を正しく選択することである。すなわち、細菌検査室では正しく薬剤感受性試験を実施しデータを提供する。一方、ベッドサイドでは提供された結果をもとに、適切な抗菌薬を選択し（臨床的に起因菌でないとは判断される場合は抗菌薬を使わないことも選択肢の一つ）、適正な量と期間投与する。耐性遺伝子の同定が治療薬の選択や感染管理に不可欠な情報を提供することはほとんどないため、個人的には耐性遺伝子の特定を細菌検査の現場に求めるべきではないと考えている。日常検査のなかで“これまでに見たことのない耐性パターン”やある種の耐性菌に“特徴的な耐性パターン”を示す菌株が見つかった場合の対応が重要である。すなわち、菌名と耐性パターンが再確認され、その後の対応に窮した場合は、専門家に相談することも考慮して良いと考える。耐性菌検出のために重要なことは“正しい検査”と“疑いをもつこと”であろう。

VI. NDM-1検出上の注意点

NDM-1がどの程度βラクタム系薬耐性に関与するのか現時点では良くわかっていない。Yongらの報告では、NDM-1を産生する肺炎桿菌株、大腸菌J53株への形質変換株、大腸菌J53株への接合伝達株のイミペネムに対するMIC値はいずれも>32 μg/mLであったが、大腸菌

Table 1. Classification schemes for plasmidic β -lactamases in Gram-negative organisms

| Molecular class | Active site | Representative enzymes |
|-----------------|-------------|---|
| A | Serine | TEM, SHV, CTX-M, VEB, KPC, SMA, PER, etc. |
| B | Zinc ion | IMP, VIM, SIM, GIM, SPM, KHM, NDM, etc. |
| C | Serine | ACT, CMY, FOX, MOX, LAT, etc. |
| D | Serine | OXA |

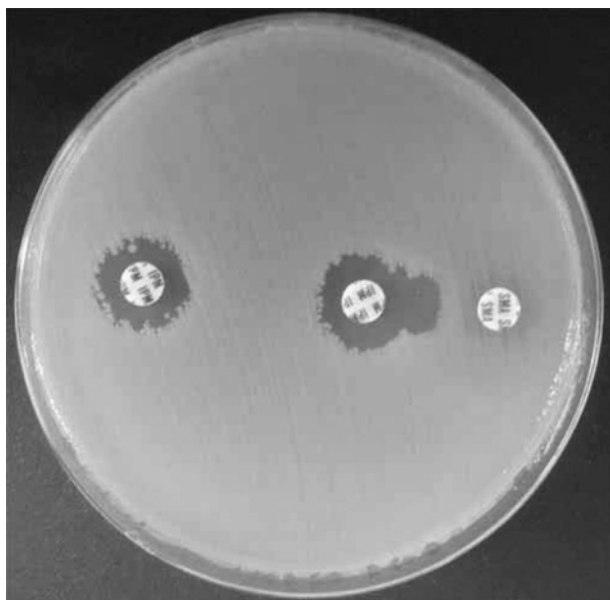


Fig. 1. Detection of metallo- β -lactamase in NDM-1 producing *Escherichia coli* using SMA and imipenem disks (IPM). The imipenem disk (IPM) on the left side of the plate shows a small zone of inhibition indicating resistance to imipenem. There is extension of the zone of inhibition from the imipenem (IPM) disk in the center towards the SMA disk indicating inhibition of a metallo- β -lactamase.

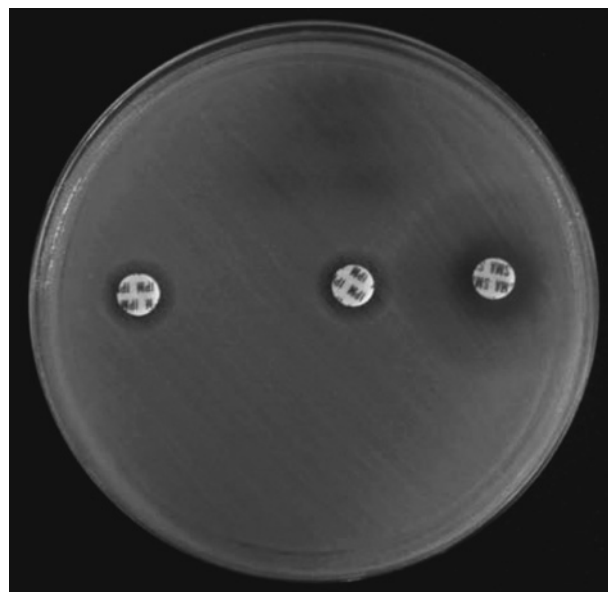


Fig. 2. Detection of metallo- β -lactamase in NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* using SMA and imipenem disks. The imipenem disk (IPM) on the left side of the plate shows no zone of inhibition indicating resistance to imipenem. There is no extension of the zone of inhibition from the imipenem (IPM) disk in the center towards the SMA disk indicating inhibition of a metallo- β -lactamase suggesting absence of a metallo- β -lactamase. In fact, this is a false negative as this isolate produced NDM-1.

TOP10 株への形質転換株の MIC 値は $12 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった⁵⁾。このことは、NDM-1 を発現する宿主によって MIC 値が異なることを示している。さらに、Poirel らの報告では、臨床材料から分離された NDM-1 産生大腸菌のイミペネムに対する MIC 値は $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、形質転換株の MIC 値は $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり⁹⁾、Clinical and Laboratory Standards Institute の旧ブレイクポイントではいずれも感性和と判定される¹⁰⁾。すなわち、NDM-1 産生株の多くを検出するためには、CLSI の新ブレイクポイント (Table 1) に従って判定する必要がある¹¹⁾。

NDM-1 は MBL の一種なので著者らは上記の国内で分離された NDM-1 産生大腸菌を対象にメタロ β ラクターマーゼ SMA “栄研” (SMA ディスク: 栄研化学株式会社) を用い、その検出を試みた。その結果、陽性反応が認められ、この結果を見る限り SMA ディスクを用いた検出法に問題はないと考えられた (Fig. 1)。一方、海外の NDM-1 産生肺炎桿菌 1 株を用いて検出を試みたところ、

先の NDM-1 産生大腸菌の結果とは異なり、SMA ディスクで陽性反応を認めなかった (Fig. 2)。この結果は、日本で汎用されている SMA ディスクを用いると、NDM-1 産生株が MBL 陰性と判定される可能性があることを示している。一方、0.5M の ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液 $20 \mu\text{L}$ を感受性測定用の空ディスクに滴下して検出を試みたところ、阻止帯の拡張を認め、MBL 産生菌であることが確認された (Fig. 3)。また、諸外国では MBL の検出に MBL Etest[®] (シスメックス株式会社) が用いられている。この製品の IPI と記載されているストリップ部分にはイミペネムとともに MBL の阻害薬である EDTA を含有している。MBL Etest[®] を用いて NDM-1 産生肺炎桿菌を対象に MBL の検出を試みたところ、MBL 産生株であることが正しく判定された (Fig. 4)。同じキレート剤ではありながら、SMA と EDTA を用いた場合には菌株によっては、その違いがある可能

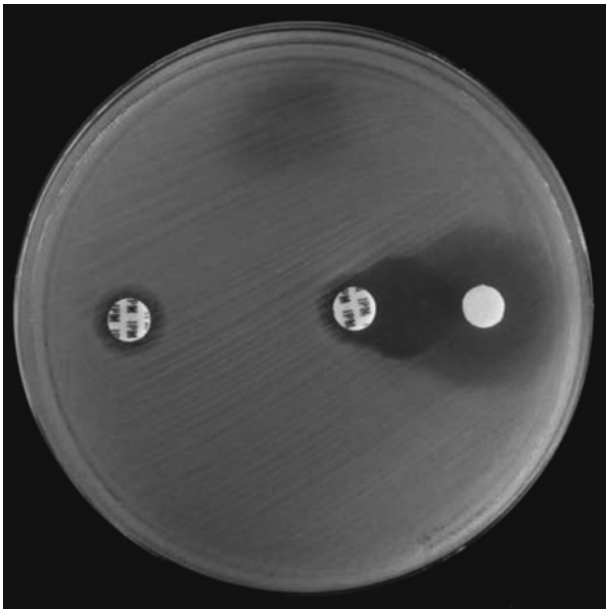


Fig. 3. Detection of metallo- β -lactamase in NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* using EDTA and imipenem disks. The imipenem disk (IPM) on the left side of the plate shows no zone of inhibition indicating resistance to imipenem. There is extension of the zone of inhibition from the imipenem (IPM) disk in the center towards the EDTA disk (without label: this disk contained 20 μ L of 0.5M EDTA solution) indicating inhibition of a metallo- β -lactamase.

性が示された。現時点においてその理由は不明であるが、今後 NDM-1 に対する詳細な酵素学的検討を実施すれば解明できると考えている。

VII. NDM-1 産生菌による感染症の治療

NDM-1 産生菌が検出されても必ずしも治療を要するわけではない。上述のように臨床的に起病菌でないと判断される場合や明らかに感染症を発症していない場合は、抗菌薬の投与は不要であろう。繰り返しになるが、NDM-1 産生菌であっても有効な抗菌薬が存在する可能性もあることから、薬剤感受性試験成績をもとに有効と考えられる抗菌薬を選択すべきである。不幸にも単剤で有効な抗菌薬がない場合は、他の多剤耐性菌と同様に併用療法を考慮すべきであろう。

Yong らの薬剤感受性試験成績はコリスチンとチゲサイクリンの有用性を示唆している⁵⁾。コリスチンおよびチゲサイクリンは日本で承認されておらず、一般病院で使用するのが困難である。現在、コリスチンは多剤耐性グラム陰性菌感染症治療薬として再承認の動きがある。しかし、セラチア属菌やプロテウス属菌などはコリスチンに自然耐性を示すこと、さらに供試菌株は少ないが多剤耐性肺炎桿菌では 27.6%、多剤耐性大腸菌では 11.5% の菌株が耐性を示したとの報告がある¹²⁾。

Poirel らの報告によるとオーストラリアで分離された NDM-1 産生大腸菌は、テトラサイクリン、コリスチン、チゲサイクリンおよびホスホマイシンに対して感性を示

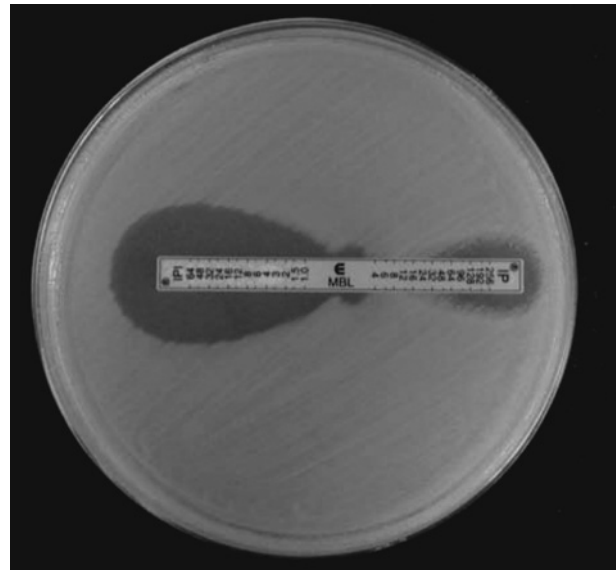


Fig. 4. Detection of metallo- β -lactamase in NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* using MBL Etest strip. The minimum inhibitory concentration of imipenem (IP) was 64 μ g/mL (IP). The minimum inhibitory concentration in the presence of EDTA (IPI) was ≤ 1.0 μ g/mL. This decrease of MIC in the presence of a metal chelator indicates that this isolate produces a metallo- β -lactamase.

したと述べている⁹⁾。CLSI はホスホマイシンのブレイクポイントを尿路感染症に対してのみ示している（感性： ≤ 64 μ g/mL¹⁰⁾）。諸外国では、ESBL 産生大腸菌など、耐性菌による尿路感染症治療にホスホマイシンの投与が検討されている¹³⁾。海外で発売されているホスホマイシンがトロメタモール塩であるのに対して、日本の製剤はナトリウム塩（注射薬）あるいはカルシウム塩（経口薬）であり、本邦で使用できるホスホマイシンは病状によっては投与しにくいと考えられる。さらに、スペインからはホスホマイシンの使用量の増加とともに耐性株の分離頻度が増加したとの報告もある¹⁴⁾。Wachino らは 192 株の CTX-M-型 β ラクタマーゼ産生大腸菌を対象に検討したところ、3.6% の菌株がホスホマイシンに感性を示さなかったと述べている¹⁵⁾。ホスホマイシンの使用に際しては耐性菌の動向にも十分な注意を払う必要があると考えている。

VIII. おわりに

現時点において NDM-1 産生菌の病原性が NDM-1 非産生菌と比較して高病原性であることは示されていない。したがって、筆者は報道にあるような「スーパー耐性菌」という表現に違和感がある。これまでに蓄積された NDM-1 に関する知見は十分ではなく、限られた情報のなかから本酵素について述べてきた。NDM-1 産生株を含む多剤耐性菌が病院内で見つかった場合、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) や多剤耐性緑膿菌 (MDRP) などと同様、接触感染対策を行っていれば、その病院内における拡散は制御できると考えている。しか

し、インドでは *bla*_{NDM-1} 産生株による市中感染が発生している可能性も指摘されている^{4,6)}。また、当初は腸内細菌科に属する菌種のみ拡散していた *bla*_{NDM-1} が *Acinetobacter baumannii* から検出されたと報告されている¹⁶⁾。今後も、NDM-1 産生株を含む多剤耐性株の動向には注意を払いながら、冷静に対応することが肝要であると考えている。

文 献

- 1) Bush K, Jacoby G A: Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76
- 2) Livermore D M, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini G M, Arlet G, et al: CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 165-74
- 3) Queenan A M, Bush K: Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58
- 4) Alekshun M N, Levy S B: Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 2007; 128: 1037-50
- 5) Yong D, Toleman M A, Giske C G, Cho H S, Sundman K, Lee K, et al: Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5046-54
- 6) Deshpande P, Rodrigues C, Shetty A, Kapadua F, Hedge A, Soman R: New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM-1) in *Enterobacteriaceae*: Treatment options with Carbapenems Compromised. *J Associ Physic India* 2010; 58: 147-9
- 7) Kumarasamy K K, Toleman M A, Walsh T R, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al: Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 597-602
- 8) Limbago B, Kallen A: Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo- β -lactamase - United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59: 750
- 9) Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P: Emergence of metallo- β -lactamase NDM-1-producing multidrug resistant *Escherichia coli* in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 (in press)
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20, Wayne, PA, 2010
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement (June 2010 Update). M100-S20-U, Wayne, PA, 2010
- 12) Falagas M E, Maraki S, Karageorgopoulos D E, Kastoris A C, Mavromanolakis E, Samonis G: Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *Enterobacteriaceae* isolates to fosfomycin. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 240-3
- 13) Falagas M E, Kastoris A C, Kapaskelis A M, Karageorgopoulos D E: Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 43-50
- 14) Oteo J, Orden B, Bautista V, Cuevas O, Arroyo M, Martinez-Ruiz R, et al: CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomycin. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 712-7
- 15) Wachino J, Yamane K, Suzuki S, Kimura K, Arakawa Y: Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3061-4
- 16) Karthikeyan K, Thirunarayan M A, Krishnan P: Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2253-4

Characteristics of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1), a novel carbapenem resistance factor

Yoshikazu Ishii

Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Toho University School of Medicine,
5-21-16 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo, Japan

A novel metallo- β -lactamase NDM-1 —New Delhi metallo- β -lactamase-1— was named and reported by Yong et al. in 2009. NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates were reported in the United States and United Kingdom. Like other plasmidic metallo- β -lactamases, NDM-1 hydrolyzes most β -lactams with the exception of monobactams. Typically, *bla*_{NDM-1} is detected in *E. coli* or *K. pneumoniae* isolated from undergoing healthcare exposure in India, Bangladesh, or Pakistan. In Japan, an NDM-1-producing *E. coli* was isolated in 2009 from a subject at University Hospital in Tochigi Prefecture who had been hospitalized in India. Although few basic studies on NDM-1 and the epidemiology of NDM-1-producing isolates exist, I review and discuss *bla*_{NDM-1}, NDM-1-producing bacteria, and bacteria detection.