【原著・基礎】

近畿地区における *Escherichia coli* および *Klebsiella* spp. 以外の腸内細菌科からの extended–spectrum β–lactamase 産生菌の分離調査

小松　方[1]・木下　承皓[2]・佐藤かおり[3]・山崎　勝利[4]
西尾　久明[5]・浦　敏郎[5]・島川　宏一[1]・相原　雅典[1)a]

[1]天理よろづ相談所病院臨床病理部*（[a]近畿耐性菌研究会代表），
[2]神戸大学医学部附属病院中央検査部，[3]近畿大学医学部附属病院中央臨床検査部，
[4]和歌山労災病院検査科，[5]滋賀県立成人病センター検査部，
[6]国立循環器病センター臨床検査部

（平成 13 年 12 月 20 日受付・平成 14 年 1 月 16 日受理）

Escherichia coli および *Klebsiella* spp. 以外の腸内細菌科菌の extended–spectrum β–lactamase を double–disk synergy test（DDST）により簡易に検出する方法を開発した。近畿地区の基幹 6 医療施設から分離された 8 菌種 903 株を使用し，cefotaxime（CTX）あるいは ceftazidime（CAZ）の MIC が≧16 μg/mL を示した株を抽出し，cefepime，CTX および CAZ 含有ディスクを使用した DDST で ESBL 産生性をスクリーニングした。MIC≧16 μg/mL の株は 88 株（9.7%）あり，うち DDST 陽性は 10 株（1.1%）であった。施設別の ESBL 陽性率は 0～2.9% で，高度特定機能施設で多く認められる傾向があった。DDST 陽性となった菌種は *Enterobacter cloacae* 4 株（1.6%），*Citrobacter freundii* 4 株（6.3%），*Serratia marcescens* 1 株（0.3%）および *Proteus mirabilis* 1 株（1.2%）であった。PCR 法で 8 株が MEN–1 関連および 2 株が Toho–1 関連遺伝子を保有していた。Random amplification of polymorphic DNA（RAPD）と enterobacterial repetitive intergenic consensus–PCR（ERIC–PCR）による genotypical marker および phenotypical marker を使用した解析で，同一施設内で分離された ESBL 産生菌は同一タイプがなく，いずれも散発的な発生であることが示唆された。

Key words: *Serratia marcescens*，*Enterobacter cloacae*，PCR，double–disk synergy test，ESBL

本邦で分離される *Escherichia coli* および *Klebsiella* spp. が産生する拡張型β–ラクタマーゼ（ESBLs）の疫学的背景はいくつかの報告[1~3]が認められほぼ明らかとなった。これは，National Committee for Clinical Laboratory Standards（NCCLS）が提案した *E. coli* および *Klebsiella* spp. における ESBLs 産生菌検出指針[4]が各臨床検査室で採用されたことによる要因が大きい。*E. coli* および *Klebsiella* spp. が産生する ESBLs は NCCLS が提案した方法により検出可能であり，本邦においてもそれらの菌による疾患の疫学的背景が明らかにされつつある。他方，検出法が確立されていない，*E. coli* および *Klebsiella* spp. 以外の ESBLs 産生性腸内細菌科菌種による疾患の報告は，世界的にも少なく，本邦における実態は把握し得ない状態である。今回，検出法が確立されていない ESBLs 産生腸内細菌科菌の ESBLs 検出法を確立する目的とその分離状況および臨床背景の調査を行った。

I. 材 料 と 方 法

1.　対象株

2000 年 1 月 1 日から 6 月 30 日までに近畿地区 6 府県の 6 施設（300 病床～1000 病床）から分離された臨床分離株で，*E. coli* および *Klebsiella* spp. 以外の腸内細菌科 8 菌種 903 株を対象とした（Table 1）。

2.　ESBL 産生菌の検出および同定

菌株は cefotaxime（CTX）または ceftazidime（CAZ）にどちらか一方または両者の MIC が 16 μg/mL 以上を示した株を抽出し，double–disk synergy test（DDST）[7] により ESBLs 産生菌の検出を行った。DDST は NCCLS 標準ディスク拡散法の手技[5]にのっとり菌を接種した。その後，amoxicillin/clavulanic acid（AMPC/CVA）ディスクの中心から 25 mm の間隔で cefpodoxime（CPDX），CAZ，CTX および cefepime（CFPM）ディスク（いずれも KB ディスク（栄研化学））を使用し配置した。35℃，一夜培養後，いずれかのディスクで CVA による阻害効果が認められた株を PCR[3,7]により CTX–M group，SHV および TEM 型にタイピングした。さらに CTX–M group は MEN–1 群（CTX–M–1），Toho–1 群（CTX–M–2），および Toho–2 群（CTX–M–9）[8]の 3 タイプに型別した。

3.　MIC 測定とクラブラン酸による ESBL 阻害効果判定

*奈良県天理市三島町 200

ESBLs 遺伝子陽性であった株は，日本化学療法学会標準法[9]にしたがって各種抗菌薬の MIC を測定した。また，CVA による ESBL 阻害効果を判定する目的で，抗菌薬原末を用いて，CFPM（明治製菓），cefpirome（CPR，塩野義製薬），cefoselis（CFSL，藤沢薬品工業），cefozopran（CZOP，武田薬品），CAZ（田辺製薬），CTX（ヘキスト），ceftriazone（CTRX，ロシュ）および aztreonam（AZT，エーザイ）の MIC 測定を CVA（スミスクライン・ビーチャム）4 μg/mL 添加による MIC 値の低下をみた。方法は，NCCLS ESBL confirmetion test[4]を使用した。

4. 菌種間の相同性の確認

PCR 法で ESBL 産生が明らかとなった株は，菌種間の遺伝子レベルでの相同性を確認するため，同一の種でかつ同一の ESBLs 遺伝子保有株間で HLWL–74（5′–CGTCTATGCA–3′）および 1254（5′–AACCCACGCC–3′）の混合プライマー[10]を用いた random amplification of polymorphic DNA（RAPD）および ERIC 2（5′–AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG–3′）[11]プライマーを用いた enterobacterial repetitive intergenic consensus–PCR（ERIC–PCR）を用いて比較した。また *Serratia marcescens* は血清型別（デンカ生研），MicroScan Neg BP Comb 3 J panel（DADE Behering）による biochemical profile，および上記抗菌薬測定成績を用いた kanamycin（KM），gentamicin（GM），tobramycin（TOB），amikacin（AMK），chloramphenicol（CP），minocycline（MINO），levofloxacin（LVFX）および trimethoprim/sulphamethoxazole（ST）の耐性 antibiogram よる解析を行った。

5. ESBL 産生株の臨床背景調査

各施設別でカルテ検索により患者情報，抗菌薬投与法などの調査を行った。

II. 結　果

Table 2 に 903 株のなかから CTX または CAZ による MIC が 16 μg/mL 以上を示した株数と DDST の成績を示した。MIC の抽出条件を満たしたのは全部で 88 株（9.7%）あり，そのうち 10 株（1.1%）が DDST 陽性となった。DDST で CVA との間にもっとも高率に阻止帯を形成した抗菌薬は CFPM で 10 株中 10 株が陽性となった。一方，他のディスクでは CTX で 7 株，CAZ で

Table 1. Bacterial strain isolated from 6 hospitals

Organism	No. of strains	%	No. and percentages (%) of strains in hospitals											
			A		B		C		D		E		F	
Serratia marcescens	301	(33.3)	8	(9.2)	99	(37.5)	13	(13.4)	0	(0.0)	146	(52.0)	35	(25.0)
Enterobacter cloacae	250	(27.7)	24	(27.6)	99	(37.5)	24	(24.7)	14	(41.2)	47	(16.7)	42	(30.0)
Enterobacter aerogenes	96	(10.6)	29	(33.3)	9	(3.4)	5	(5.2)	3	(8.8)	22	(7.8)	28	(20.0)
Proteus mirabilis	82	(9.1)	7	(8.0)	21	(8.0)	14	(14.4)	9	(26.5)	22	(7.8)	9	(6.4)
Citrobacter freundii	63	(7.0)	8	(9.2)	16	(6.1)	15	(15.5)	8	(23.5)	8	(2.8)	8	(5.7)
Morganella morganii	58	(6.4)	3	(3.4)	13	(4.9)	16	(16.5)	0	(0)	15	(5.3)	11	(7.9)
Proteus vulgaris	45	(5.0)	6	(6.9)	7	(2.7)	8	(8.2)	0	(0)	19	(6.8)	5	(3.6)
Providencia spp.	8	(0.9)	2	(2.3)	0	(0)	2	(2.1)	0	(0)	2	(0.7)	2	(1.4)
Total	903	(100)	87	(100)	264	(100)	97	(100)	34	(100)	281	(100)	140	(100)

Table 2. Result of strains indicated rather than 16 μg/mL of MIC of cefotaxime and/or ceftazidime, and double–disk synergy test in each hospital

Organism	Total no. of strains	%[b]	No. of strains isolated from hospitals					
			A	B	C	D	E	F
Serratia marcescens	30	(10.0)	4	16	3	0	7	0
Enterobacter cloacae	27	(10.8)	2	10	2	4	5	4
Enterobacter aerogenes	7	(7.3)	2	0	0	1	0	4
Proteus mirabilis	1	(1.2)	0	0	0	1	0	0
Citrobacter freundii	18	(28.6)	5	5	3	2	2	1
Morganella morganii	3	(5.2)	0	0	1	0	0	2
Proteus vulgaris	2	(4.4)	2	0	0	0	0	0
Providencia spp	0	(0.0)	0	0	0	0	0	0
Total	88	(9.7)	15	31	9	8	14	11
No. of DDST[a]–positive	10		1	7	0	1	1	0
DDST–positive%[c]	(1.1)		(1.1)	(2.7)	(0.0)	(2.9)	(0.4)	(0.0)

[a] DDST: double–disk synergy test
[b] Percentages against total isolated number of same species
[c] Percentages against total isolated number of same hospital

5 株および CPDX で 3 株が陽性となった。このうち，3 株は CFPM のみに阻止帯を形成し，その拡張度も CFPM がもっとも鮮明であった。施設別の DDST 陽性数は 0〜6 株（0〜2.9%）であったが，特定の施設から 6 株の ESBL 産生株が分離された。菌種別の DDST 陽性株は *Enterobacter cloacae* 4 株（同一種の分離総数に対する割合; 1.6%），*Citrobacter freundii* 4 株(6.3%)，*Serratia marcescens* 1 株（0.3%）および *Proteus mirabilis* 1 株（1.2%）であった。

DDST 陽性を示した 10 株の MIC と PCR の成績は Table 3 に示した。DDST 陽性であった 10 株の PCR による分析により，すべての株から何らかの ESBL 遺伝子が検出された。その内訳は，MEN–1–関連 ESBL 産生が 8 株，Toho–1–関連 ESBL 産生が 2 株であった。これら ESBL 遺伝子が検出された菌の感受性特徴としては cefmetazole 耐性（ただし I を含む）が 9 株，latamoxef 耐性が 2 株，および flomoxef（FMOX）耐性が 8 株認められた。β–ラクタマーゼ阻害剤との合剤では，AMPC/CVA に 8 株および cefoperazone/sulbactam に 7 株の耐性が認められた。β–ラクタム薬以外の抗菌薬では GM 耐性 1 株，AMK 耐性 5 株，MINO 耐性 4 株，CP 耐性 4 株および LVFX 耐性 3 株認められた。

Table 4 に DDST 陽性を示した 10 株のオキシイミノ型セファロスポリンおよび AZT を用いた CVA による酵素反応阻害効果を検討した成績を示した。単剤の場合と比較して第 4 世代セフェム群(CFPM，CPR，CZOP，CFSL）ではほぼすべてが CVA 添加により MIC が 3 管以上低下したのに対し，残りの薬剤では MIC が 3 管以上低下を認めなかった株が 3〜8 株に認めた。

菌種間の相同性の検討では，MEN–1–関連 ESBL 産生性 *E. cloacae*，*C. freundii* および *S. marcescens* と，これ以外に近畿耐性菌研究会で保存されていた MEN–1–関連 ESBL 産生株 25 株を同じ菌種間で RAPD により比較した(Fig. 1)。*E. cloacae* では今回の検討で分離された施設 B からの 3 株と 1999 年に同じく施設 B で分離された 4 株の計 7 株の比較では，すべて別のバンドパターンとなった。また，B 以外の 3 施設から分離された株との比較でも同一パターンを示す株は認めなかった。*C. freundii* は施設 B から 3 株分離されたが，すべて異なるバンドパターンとなった。*S. marcescens* は今回検出した 1 株の MEN–1 産生株に，当研究会保存株 14 株を追加して検討した(Table 5)。今回の研究では施設 E から検出された 1 株の RAPD パターンは，同施設で 1999 年に分離された 4 株と同一のパターンを示した。一方，他の 9 株は E とは異なる 10 施設（大阪府 4 施設，高知県 1 施設，奈良県 2 施設，広島県 1 施設，京都府 1 施設，東京都 1 施設）から分離されたものであったが，うち 8 施設（広島県と東京都

Table 3.　MICs and ESBL gene types of double–disk synergy test–positive strains

Organism[a)]	Strain no.	Hospital	ESBLs gene	MIC (μg/mL)[b)] PIPC	AMPC/CVA	CMZ	LMOX	FMOX	CPZ/SBT	CTX	CAZ	MEPM	GM	AMK	MINO	CP	ST	LVFX
C. f	841	B	MEN–1–derived	＞128	＞16	＞32	≦8	＞16	＞32	＞32	＞16	≦0.25	≦4	≦16	≦4	≦8	＞2	＞4
C. f	842	B	MEN–1–derived	＞128	＞16	＞32	≦8	≦8	＞32	＞32	16	≦0.25	≦4	≦16	≦4	＞16	≦0.5	≦2
C. f	843	B	MEN–1–derived	＞128	≦8	≦16	≦8	≦8	≦16	＞32	≦8	≦0.25	≦4	＞32	≦4	＞16	＞2	1
E. cl	844	B	MEN–1–derived	＞128	＞16	＞32	16	＞16	＞32	＞32	＞16	≦0.25	≦4	32	＞8	＞16	2	4
E. cl	850	B	MEN–1–derived	＞128	＞16	＞32	≦8	＞16	＞32	＞32	＞16	≦0.25	≦4	≦16	≦4	≦8	≦0.5	＞4
E. cl	845	B	MEN–1–derived	＞128	＞16	＞32	≦8	＞16	≦16	＞32	≦8	≦0.25	≦4	≦16	≦4	＞16	≦0.5	≦2
E. cl	846	B	MEN–1–derived	＞128	＞16	＞32	≦8	16	32	＞32	≦8	≦0.25	≦4	≦16	≦4	≦8	≦0.5	≦2
C. f	847	A	Toho–1–derived	＞128	＞16	32	≦8	16	＞32	＞32	≦8	≦0.25	≦4	＞32	8	≦8	≦0.5	≦2
P. m	848	D	Toho–1–derived	＞128	≦8	32	≦8	16	≦16	＞32	≦8	≦0.25	≦4	32	＞8	≦8	≦0.5	≦2
S. m	849	E	MEN–1–derived	＞128	＞16	＞32	＞16	＞16	32	＞32	≦8	0.5	8	＞32	8	≦8	≦0.5	≦2

a) C. f: *C. freundii*, E. cl: *E. cloacae*, P. m: *P. mirabilis*, S. m: *S. marcescens*

b) PIPC: piperacillin, AMPC/CVA: amoxicillin/clavulanic acid, CMZ: cefmetazole, LMOX: latamoxef, FMOX: flomoxef, CPZ/STB: cefoperazone/sulbactam, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, MEPM: meropenem, GM: gentamicin, AMK: amikacin, MINO: minocycline, CP: chloramphenicol, ST: trimethoprim/sulfamethoxazole, LVFX: levofloxacin

Table 4. MIC change of each antibiotics by addition of 4 μg/mL clavulanic acid

Organism[a)]	Strain no.	MIC (μg/mL)[b)] CFPM	CFPM+CVA	CPR	CPR+CVA	CZOP	CZOP+CVA	CFLS	CFLS+CVA	AZT	AZT+CVA	CAZ	CAZ+CVA	CTX	CTX+CVA	CTRX	CTRX+CVA
C.f	841	16	1	128	2	64	4	32	4	32	32	>128	>128	128	64	>128	128
C.f	842	>128	≦0.25	>128	≦0.25	>128	≦0.25	128	≦0.25	64	≦0.25	128	16	>128	0.5	>128	0.5
C.f	843	16	≦0.25	>128	≦0.25	>128	≦0.25	32	≦0.25	1	≦0.25	32	2	>128	≦0.25	>128	≦0.25
E.cl	844	32	2	128	1	128	16	32	1	32	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128
E.cl	850	64	2	>128	1	128	1	64	16	32	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128
E.cl	845	4	≦0.25	16	≦0.25	64	≦0.25	1	≦0.25	2	≦0.25	1	4	64	0.5	128	0.5
E.cl	846	32	≦0.25	>128	≦0.25	>128	≦0.25	32	≦0.25	1	≦0.25	16	4	>128	1	>128	0.5
C.f	847	64	≦0.25	>128	≦0.25	>128	≦0.25	64	≦0.25	16	≦0.25	32	4	>128	≦0.25	>128	0.5
P.m	848								not tested								
S.m	849	128	1	>128	1	>128	4	128	1	128	4	64	16	>128	1	>128	1

a) C.f: *C. freundii*, E.cl: *E. cloacae*, P.m: *P. mirabilis*, S.m: *S. marcescens*

b) CFPM: cefepime, CPR: cefpirome, CZOP: cefozopran, CFLS: cefoselis, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, CTRX: ceftriaxone. 4 μg/mL of clavulanic acid were added to each oxyiminotype cepharosporin and aztreonam

以外）から分離された株とも同一のパターンを示した。これら *S. marcescens* の 15 株の MicroScan panel 用いた phenotypical な分析結果で，serotyping は 5 パターン（うち 1 株はタイピング不可），biochemical profile は 4 パターン，antibiogram では 10 パターンに分れた。

患者の背景を調査した成績を Table 6 に示した。入院は 8 例，年齢は小児が 2 例，70 歳以上が 6 例であった。検体は，尿由来 6 例，喀痰由来 2 例，術創排膿液由来および膣分泌物由来が各 1 例であり，尿から分離された 2 例を除く 8 例が ESBL 産生菌による感染と判断された。治療薬は尿由来 6 例中 4 例が菌検出前には抗菌薬投与がなく，菌検出後 3 例にそれぞれ cefcapene（case no.1），cefotiam（case no.2），および norfloxacin（case no.3）が使用され，うち 2 例（case no.1 と 2）は症状の改善と菌消失を認めた。小児 2 例（case no.5 と 6）はいずれも白血病の化学療法中で，尿の監視培養から菌が検出され，症状はなく無症候性に経過した。この 2 例の抗菌薬投与は感染予防投与としてそれぞれ FMOX および ST が使用されていた。FMOX が投与された例は MIC も 16 μg/mL 以上と高く，治療薬として ST が追加され菌の消失が認められた。ST が投与されていた例は骨髄移植後 GVHD を併発し，その直後に死亡したため効果判定が不能であった。喀痰から検出された 2 例はいずれも肺炎患者であったが，うち 1 例目（case no.7）は熱傷に肺炎を併発した患者で，吸引痰より *E. cloacae* を検出し，CAZ 2 g/day，12 日間投与により軽快した。2 例目（case no.8）は膵炎後肺炎をきたした患者で，喀痰から *C. freundii* と *Klebsiella* spp. が検出され，LVFX と ST が投与され症状の改善と菌の消失を認めた。創感染例（case no.9）は cefditren 300 mg/day，7 日間と GM 軟膏が使用され軽快，膣炎例（case no.10）は菌検出後 FMOX が 3 g/day，7 日間投与されたが，治療開始後 7 日目に退院となり予後を見きわめることができなかった。

III. 考 察

今回の調査における *E. coli* および *Klebsiella* spp. 以外の ESBL 産生菌の分離率は，総分離数の 1.1% であった。これにより多くの腸内細菌科菌種へも ESBL 遺伝子が拡散していることが明らかとなった。遺伝子型はいずれも CTX–M family で，わが国でもっとも多く検出されている型であった[1~3)]。病院間の分離率には偏りがあり，特に特定機能病院から多く認められた。このような特定施設での高率な検出は施設内におけるアウトブレークによる拡散が疑われたが，*E. cloacae* および *C. freundii* での RAPD および ERIC–PCR による解析で，それらは別々のクローンであった。しかし，この施設由来の ESBL 遺伝型はすべて MEN–1 derived–ESBL であり，かつ今回の調査期間外にも断続的に同一

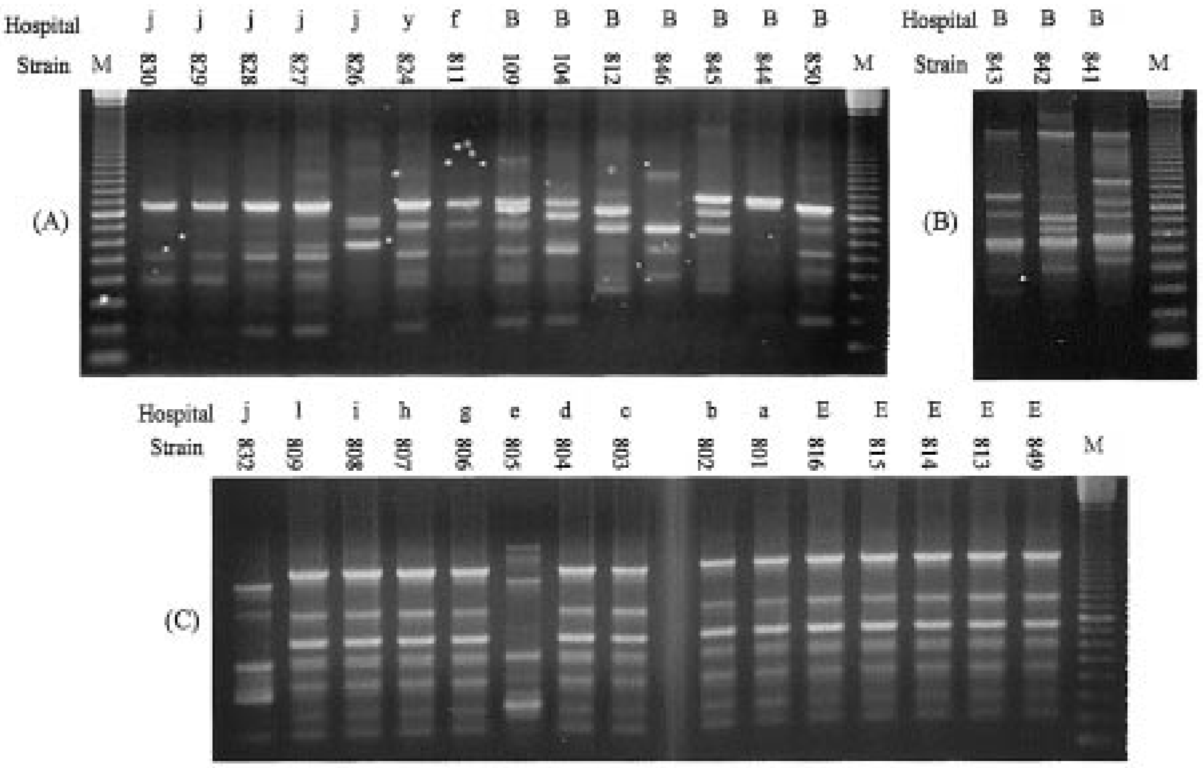

Fig. 1. Electrophoresis for PCR fingerprinting using ERIC 2 primer. Three photographs indicate test results of MEN–1–derived ESBL producing *Enterobacter cloacae*（A）, *Citrobacter freundii*（B）and *Serratia marcescens*（C）. *E. cloacae* strain 844, 850 and 845 from Hospital B, *C. freundii* strain 843, 842 and 841 from Hospital B, *S. marcescens* strain 849 from Hospital E were isolated from this study. Three strains（812, 104 and 109）from Hospital B, 4 strains（813, 814, 815 and 816）from Hospital E and some strains from other hospitals（j, y, f, l, h, e, d, c, i, b and a）were used as contast strain of epidemiological analysis. These contrast strains were isolated from the period outside of this study. M, 100 Base–Pair Ladder™ molecular weight marker（Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA）.

Table 5. Epidemiological analysis of MEN–1 derived ESBL producing *Serratia marcescnes*

Stain no.[a)]	Source or prefecture	PCR fingerprint		Serotype	MicroScan panel profile	Antibiogram[b)]
		HLWL–74 and 1254	ERIC 2			
849	Hospital E	1	A	O 2	74405356	km, gm, tob, amk, cp, lmox
813	Hospital E	1	A	untypeable	74605356	km, tob, cp, lvfx, lmox
814	Hospital E	1	A	O 2	70405356	km, gm, tob, amk, cp, lvfx, lmox
815	Hospital E	1	A	O 2	74405356	km, gm, tob, amk, mino, cp, lvfx, lmox
816	Hospital E	1	A	O 2	74405356	km, gm, tob, amk, mino, cp, lvfx, lmox
801	Ohsaka	1	A	O 2	74405356	km, gm, tob, amk, lmox
802	Kouchi	1	A	O 2	74405356	km, tob, amk, mino, cp, lvfx, lmox
803	Nara	1	A	O 2	74405356	km, tob, amk, mino, cp, lvfx, lmox
804	Nara	1	A	O 2	74605356	km, tob, lmox
805	Hiroshima	2	B	O 6	70405356	km, tob
806	Ohsaka	1	A	O 2	74405356	km, tob, amk, lmox
807	Kyoto	1	A	O 2	74405356	km, tob, amk, mino, cp, lvfx
808	Osaka	1	A	O 14	74405356	km, tob, amk, mino, cp, lvfx, lmox
809	Osaka	1	A	O 2	74605356	km, tob, amk, mino, cp, lvfx, lmox
832	Tokyo	2	C	O 17	70445356	tob, cp

[a)]Strain 849 was isolated from this study. The other strains were used as contast strains of epidemiological analysis. Strain 813, 814, 815, and 816 in Hospital E were isolated from the period outside of this study

[b)]Antibiogram expressed as resistance profile based on testing kanamycin（km）, gentamicin（gm）, tobramycin（tob）, amikacin（amk）, minocycline（mino）, chloramphenicol（cp）, levofloxacin（lvfx）, and latamoxef（lmox）

Table 6.　Patient information infected and/or colonized by ESBL–producing organism[a)]

Case no.	Organ-ism	Hospital	Word	Age/Gender	Infection type	Specimen	Antibiotic therapy（dose per day）				Clinical effect
							before[c)]	period	after[d)]	period	
1	C. f	B	out	76/F	UTI	Urine	no therapy	—	CFPN（200 mg）	5 d	good
2	C. f	B	in	70/M	UTI	Urine	no therapy	—	CTM（2 g）	3 d	good
3	P. m[b)]	D	out	70/M	UTI	Urine	no therapy	—	NFLX（600 mg）	7 d	unknown
4	S. m	E	in	52/M	UTI	Urine	no therapy	—	no therapy	—	unknown
5	E. cl	B	in	8/M	Asymptomatic	Urine	FMOX（3 g）	10 d	FMOX（3 g），ST（2 tab）	10 d	unknown
6	C. f	B	in	14/M	Asymptomatic	Urine	ST（2 tab）	2 m	CZOP（2 gm），AZT（4 g）	10 d	unknown
7	E. cl	B	in	82/M	Pneumonia	Sputum	IPM（1 g），ABK（200 mg）	6 d	CAZ（2 gm）	12 d	good
8	C. f[b)]	A	in	73/M	Pneumonia	Sputum	CLDM（1, 200 mg），AMK（400 mg），IPM（1 g）	6 d	LVFX（300 mg），ST（2 tab）	20 d	moderate
9	E. cl	B	in	76/M	Wound	Drainage	CPFX（600 mg）	3 d	CDTR（300 mg）	7 d	good
10	E. cl	B	in	59/F	Vaginosis	Vaginal swab	CFDN（300 mg）	5 d	FMOX（3 g）	7 d	unknown

a) C.f: *C. freundii*, E.cl: *E. cloacae*, P.m: *P. mirabilis*, S.m: *S. marcescens*, out: outpatinet, in: inpatient, F: female, M: male, UTI: urinary tract infection, FMOX: flomoxef, ST: trimethoprim/sulphamethoxazole: IPM: imipenem: ABK: arbekacin, CLDM: clindamycin, AMK: amikacin, CPRX: ciproxacin, CFDN: cefdinir, CFPN: cefcapene, CTM: cefotiam, NFLX: norfloxacin, CZOP: cefozopran, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidime, LVFX: levofloxacin, CDTR: cefditoren, m: month, d: day

b) Toho–1–derived ESBL producer

c) “Before” means that before the ESBL–producing strain was detected

d) “After” means that after ESBL–producing strain was detected

タイプの ESBL が分離されていることから，同一のプラスミドが何らかの方法で伝播されることにより拡散している可能性が示唆された[12)]。*S. marcescnes* の RAPD および ERIC–PCR による解析では，同一施設分離株で同一のパターンを示した株が多く，特徴づけが困難であったが，Biotype や antibiogram および血清型の成績から施設 E から分離された 5 株は 4 タイプに識別された。PCR を使用した fingerprinting はパルスフィールド電気泳動法と比較して操作が簡便なため，これらの方法による遺伝子型の解析は多くの報告がある[13)]。さらにこれらの報告では迅速に成績が得られることから，日常発生するアウトブレークの解析にリアルタイムで鑑別可能な点でも優れている。しかし，*S. marcescens* の fingerprinting に関しては，他の腸内細菌科菌と比較して遺伝子型別による識別が困難であるとの報告[14, 15)]もあり，今回われわれが行った RAPD でも満足のいく成績を得ることができなかった。*S. marcescens* はゲノム中の GC%が他の腸内細菌科菌と比較して高いことが知られており[14)]，RAPD や ERIC–PCR によっても分類不可能な株が存在することが報告されている[10, 14)]。今回使用した HLWL 74+1254 プライマー[10)]でも O serotype や K serotype で異なるタイプと判定された株において同一の RAPD タイプと判定された株の存在も報告されている[10)]。Patton ら[14)]は *S. marcescnes* の RAPD に関して同様の指摘をしている。さらに Patton ら[14)]は polymorphic GC–rich repetitive sequences（PGRS）領域を使用した PCR fingerprinting の有用性を報告し，われわれもそのプロトコールにしたがって検討を行ったが，増幅されたバンドがすべて degraded してしまい判別不能であった。今後，GC 比の高い菌種に対する正確なタイピング方法[14, 16, 17)]や複数のプライマーを組み合わせて判定する方法[10)]の標準化も実施する必要があろう。

今回用いたわれわれの ESBL 確定法として Jarlier ら[5)]の報告した DDST に cefepime disk を加えて検出を行った。Table 4 にも示したように，CTX あるいは CAZ を用いた方法では今回対象とした菌種に対しては ESBL への CVA 阻害効果が十分に確認できないという意図から，あえて CFPM を追加した。これは CFPM を含む第 4 世代セファロスポリンの AmpC β ラクタマーゼへの安定性によるものと考えられた。同様の報告に CPR を用いた Tzelepi らの報告もある[18)]。また現在存在する各種 ESBL 検出法[4, 19, 20, 21)]の多くは CTX あるいは CAZ などの第 3 世代セファロスポリンを中心にした検出薬を使用しているため，AmpC を過剰に産生する菌種に対する検査適応は十分でないと考えられる。現在第 4 世代セファロスポリンを加えた検出法の精度について検討中である。

ESBL 産生菌の臨床的検討については，多くが入院例であったが，8 例は起炎菌と判定され，セファロスポリ

ンが使用された例でも効果が得られた症例も存在した。現在，NCCLS は ESBL 産生 *E. coli* および *Klebsiella* spp. に対し，セファマイシン系以外のセファロスポリン薬には感受性成績のいかんにかかわらず，耐性と判定するとの報告がある。一方，他の菌種に対する治療に関しては不明な点が多いが，*in vitro* で感性を示したセファロスポリン薬を使用し治療に失敗を示した報告[22,23]もあることから，今後，対象とした菌種に対しても治療薬選定について慎重に判断する必要がある。

（本論文の要旨は第 49 回日本化学療法学会総会にて報告し，座長推薦を受けたものである。）

謝　辞

本研究は近畿耐性菌研究会（相原雅典代表）の研究費により行われたものである。また，PCR–fingerprinting の対照菌株として *S. marcescnes* 臨床分離株を分与していただきましたファルコバイオシステムズ総合研究所の山下知成先生に深謝いたします。

文　献

1） Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, et al.: A preliminary survey of extended–spectrum beta–lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. FEMS Microbiol Lett 184: 53〜56, 2000
2） 川上小夜子，斧　康雄，山本美和，他: 帝京大学医学部附属病院における cefotaxime 耐性の *Escherichia coli* と *Klebsiella pneumoniae* の検出状況一第 1 報一。感染症誌 73: 1110〜1115, 1999
3） Komatsu M, Ikeda N, Aihara M, et al.: Hospital outbreak of MEN–1–derived extended spectrum beta–lactamase–producing *Klebsiella pneumoniae*. J Infect Chemother 7: 94〜101, 2001
4） National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Eleventh informational supplement M 100–S 11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 2001
5） Jarlier V, Nicolas M H, Fournier G, et al.: Extended broad–spectrum beta–lactamases conferring transferable resistance to newer β–lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 10: 867〜878, 1988
6） National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M 7–A 4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 1997
7） 小松　方，相原雅典，島川宏一，他: 糞便中からの extended–spectrum beta–lactamases 産生性腸内細菌の検出。感染症誌 74: 250〜258, 2000
8） Sabate M, Tarrago R, Navarro F, et al.: Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime–hydrolyzing beta–lactamase (CTX–M–9) from *Escherichia coli* in Spain. Antimicrob. Agents. Chemother. 44: 1970〜1973, 2000
9） 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度（MIC）測定法再改訂について。Chemother 29: 76〜79, 1981
10） Hejazi A, Keane C T, Falkiner F: The use of RAPD–PCR as a typing method for *Serratia marcescnes*. J Med Microbiol 46: 913〜919, 1997
11） Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 19: 6823〜6831, 1991
12） Balis E, Vatopoulos A C, Kanelopoulou M, et al.: Indications of in vivo transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Esherichia coli* of the normal human gut flora. J Clin Microbiol 34: 977〜979, 1996
13） Olive D M, Bean P: Principles and applications of methods for DNA–based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 37: 1661〜1669, 1999
14） Patton T G, Katz S, Sobieski R J, et al.: Genotyping of clinical *Serratia marcescens* isolates: a comparison of PCR–based methods. FEMS Microbiol Lett 194: 19〜25, 2001
15） Liu P Y, Lau Y, Hu B, et al.: Use of PCR to study epidemiology of *Serratia marcescnes* isolates in nosocomial infection. J Clin Microbiol 32: 1935〜1938, 1994
16） Yang Z H, Ijaz K, Bates J H, et al.: Spoligotyping and polymorphic GC–rich repetitive sequence fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS 6110. J Clin Microbiol 38: 3572〜3576, 2000
17） Jang T N, Fung C P, Yang T L, et al.: Use of pulsed–field gel electrophoresis to investigate an outbreak of *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect 48: 13〜19, 2001
18） Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, et al.: Detection of extended–spectrum β–lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. J Clin Microbiol: 542〜546, 2000
19） Hadziyannis E, Tuohy M, Thomas L, et al.: Screening and confirmatory testing for extended spectrum beta–lactamase (ESBL) in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 36: 113〜117, 2000
20） Ho P L, Chow K H, Yuen K Y, et al.: Compalison of a novel, inhibitor–potentiated disk–diffusion test with other methods for the detection of extended–spectrum beta–lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 42: 49〜54, 1998
21） Cormican M G, Marshall S A, Jones R N: Detection of extended–spectrum beta–lactamase (ESBL)–producing strains by the Etest ESBL screen. J Clin Mirobiol 34: 1880〜1884, 1996
22） Wong–Beringer A, Hindler J, Loeloff M, et al: Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. Clin Infect Dis 34: 135〜146, 2002
23） Thomson K S, Moland E S: Cefepime, piperacillin–tazobactam, and the inoculum effect in tests with

extended – spectrum beta – lactamase – producing *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 45: 3548〜3554, 2001

Epidemiology of extended–spectrum beta–lactamase producing *Enterobacteriaceae* excluding *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolated from 6 hospitals in Kinki, Japan

Masaru Komatsu[1), Shouhiro Kinoshita[2), Kaori Sato[3), Katutoshi Yamasaki[4), Hisaaki Nishio[5), Toshiro Ura[5), Kouichi Shimakawa[1) and Masanori Aihara[1)

[1)Clinical Pathology Department, Tenri Hospital, 200 Mishima, Tenri, Nara 632–8552, Japan

[2)Clinical Laboratory Department, Kobe University Hospital

[3)Clinical Laboratory Department, Kinki University Hospital

[4)Clinical Laboratory Department, Wakayama Rosai Hospital

[5)Clinical Laboratory Department, Shiga Medical Center for Adults

[6)Department of Clinical and Laboratory Medicine, National Cardiovascular Center

(Bacterial Resistance Reseach Group in Kinki, Japan)

Extended–spectrum β–lactamase producing *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., especially AmpC β–lactamase producing organisms, were examined from January to June 2000; 903 isolates were isolated from 6 hospitals in Kinki, Japan. Of these, 88 isolates (9.7%) which MICs of cefotaxime (CTX) and/or ceftazidime (CAZ) were ≧16 μg/mL, were tested by the modified double –disk synergy test (mDDST) using cepepime (CFPM), CTX, and CAZ disks. We found that 10 (1.1%) of 88 isolates were positive by mDDST, and CFPM–disk was more detectable disk than the other 2 disks. The percentage of mDDST positive isolates in 6 hospitals was 0 to 2.9%. ESBL gene types were MEN–1–derived (*Enterobacter cloacae* (4), *Citrobacter freundii* (3), *Serratia marcescens* (1)) and Toho–1 derived (*C. freundii* (1), *Proteus mirabilis* (1)). ESBL–producing isolates from the same hospital were differently cloned using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) analysis, enterobacterial repetitive intergenic consensus–PCR (ERIC–PCR), and phenotypical analysis (serotype, antibiogram and biotype).