

Metallo- β -lactamase 産生株検出における市販の確認セットの比較¹⁾ 筑豊労災病院検査科, ²⁾ ひびき臨床微生物研究会, ³⁾ 産業医科大学泌尿器科, ⁴⁾ 株式会社キューリン重高 正行¹⁾²⁾ 村谷 哲郎²⁾³⁾ 小林とも子²⁾⁴⁾
大久保孔平²⁾ 松本 哲朗³⁾

(平成 17 年 7 月 25 日受付)

(平成 18 年 3 月 22 日受理)

Key words: metallo- β -lactamase, mercaptoacetic acid, HMRZ86, 2-mercaptopropionic acid, IMP-1

要 旨

九州地区 31 施設の臨床材料から分離された metallo- β -lactamase 産生株 41 株および metallo- β -lactamase 非産生株 ceftazidime 耐性 8 株を使用し, メタロ β ラクタマーゼ SMA ‘栄研’ (SMA, 栄研化学), シカベータテスト I/MBL (CIC, 関東化学), およびドライプレート ‘栄研’ DPD1 (DPD, 栄研化学) を用いて metallo- β -lactamase の検出率について比較検討した. Metallo- β -lactamase 産生株の検出率は, SMA 97.5%, DPD および CIC は 100% といずれも優れた成績を示し, SMA により検出できなかった 1 株も判定不能であり, 偽陰性は存在しなかった. Metallo- β -lactamase 非産生 ceftazidime (CAZ) 耐性株に対しては, SMA で 37.5% (3/8) が, DPD で 62.5% (5/8) が判定不能となったが, 偽陽性は認めなかった. CIC では全株陰性と判定された. いずれの検査法とも, 陰性, 陽性, 判定不能の定義を明確にしておけば, 判定不能株は存在するものの, 偽陰性, 偽陽性は存在せず, 非常に優れた方法であると考えられた. SMA は, ディスク拡散法という細菌検査室では慣れた手技を用いる方法であり, さらに安価であることを考慮するとルチンで実施可能な方法であると考えられる. また, CIC は多少手技的に熟練を要すると考えられるが, わずか 15 分で判定が可能であり, 迅速検査として有用性は高いと考えられた. また, CAZ 高度耐性株に対して, SMA や DPD では判定不能となる場合には CIC は有用である.

〔感染症誌 80: 391~398, 2006〕

序 文

metallo- β -lactamase は, モノバクタム以外の β -lactam を分解しうる β -lactamase である. 多くの場合プラスミド上に存在しており, *Pseudomonas aeruginosa* などのブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌がこの β -lactamase を獲得すると有効な薬剤がない場合もある. また, metallo- β -lactamase 産生菌による院内感染に関する報告¹⁾もあり, 院内感染対策上重要な耐性菌でもある. したがって, 細菌検査室において早期に適確に検出し, 報告することが重要な耐性菌である. 現在 IMP-1 を主とする IMP type, VIM type, SPM type などが外来性の metallo- β -lactamase として報告されている²⁾. また, IMP type は IMP-21 まで, VIM type は VIM-12 まで, 各種 variant が報告されている. また, 我々の検討では未だ検出されていないが, 国内においても VIM-2 type が報告されている³⁾.

我々は, ひびき臨床微生物研究会共同研究として, セフェム系耐性株の検討を行っているが, この共同研究の中で, IMP-1 を主とする metallo- β -lactamase 産生株も多く分離されており, 共同研究ではすべて PCR にて確認試験を行っているが, 検査室にて実施可能な方法について, 検討を行った. Metallo- β -lactamase は, その名のとおりに活性中心に亜鉛を有しており, 検出方法としては, 既知の type の遺伝子を検出する方法, 活性中心の亜鉛とキレートすることにより, または亜鉛と結合することにより, 活性を失活させ, セフェムの分解が抑制されるかどうかを確認する方法がある. Metallo- β -lactamase の検出法については, IMP-1 遺伝子を PCR により検出する方法⁴⁾, EDTA を用いた併用試験⁵⁾などが存在し, さらに Goto らによりメルカプト化合物が阻害剤として報告された⁶⁾. 市販の metallo- β -lactamase 検出セットとして, 2000 年に metallo- β -lactamase 阻害剤である mercaptoacetic acid (MAA) を含有したディスクを用いたメタロ β ラク

別刷請求先: (〒820-0088) 福岡県嘉穂郡穂波町弁分633

筑豊労災病院検査科

重高 正行

タマーゼ SMA が栄研化学より発売され、2002 年に 2 価イオンキレート剤 Dipicolic acid (DPA) を用いたドライプレート ‘栄研’ DPD1 (栄研化学)、2004 年に AmpC β -lactamase に安定であり、metallo- β -lactamase により分解され発色するセファロスポリンを基質とし、metallo- β -lactamase 阻害剤 2-mercaptopropionic acid (MPA)⁷⁾ と併用することにより metallo- β -lactamase の存在を確認するシカベータテスト I/MBL (関東化学) が発売された。これら市販の metallo- β -lactamase 確認セット 3 種類を用いて、metallo- β -lactamase 検出について、比較検討した。

材料と方法

1. 使用菌株

2002 年から 2003 年に九州地区より分離された IMP-1 type metallo- β -lactamase 産生 *P. aeruginosa* 32 株, *Escherichia coli* 3 株, *Pseudomonas fluorescens* 5 株, IMP-2 type metallo- β -lactamase 産生 *P. aeruginosa* 1 株, metallo- β -lactamase 非産生 ceftazidime (CAZ) 耐性 *P. aeruginosa* 8 株を用いた。これらの株は、喀痰由来 3 株、尿由来 26 株、膿由来 6 株、便由来 3 株、不明 3 株、年齢別では 50 歳未満が 5 株、50 歳代 2 株、60 歳代 7 株、70 歳代 9 株、80 歳代 11 株、90 歳代 1 株、100 歳以上 1 株、不明が 5 株であった。

使用した菌株は、PCR および 2-mercaptopropionic acid (MPA, Nacalai tesque) 128 μ g/mL 併用により、用いた寒天平板希釈法により metallo- β -lactamase 産生、非産生が確認された株である。

検出を試みた β -lactamase および PCR primer は、IMP-1 (5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTT-3', 5'-CAACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'), IMP-2 (5'-TGTAGCATTACTGCCGCG-3', 5'-CAGCCTGTTCCCATGTAC-3'), VIM-1 (5'-TCTACATGACCGCGTCTGTC-3', 5'-GTGTGCTTTGACAACGTTCGC-3'), VIM-2 (5'-TGACCGGCTCTATCATGGC-3', 5'-GCTACTCAACGACTGAGCG-3') である³⁽⁸⁾。

IMP-1 の primer では、IMP-1, IMP-3, IMP-6 が検出され、IMP-2 の primer では、IMP-2, IMP-8 などの近縁の構造を有する metallo- β -lactamase が検出される。

菌株は、-80℃、40% グリセリン保存株を用い、使用する際は寒天培地に均一に塗布した後、CAZ 30 μ g 含有ディスク (栄研化学) を置き、35℃ で 16-20 時間培養した。プラスミドの脱落株を使用しないために、ディスク周囲に発育した CAZ 耐性株を使用した。

2. 薬剤感受性試験

CAZ (田辺製薬), imipenem (IPM, 万有製薬) 単

独および MPA 128 μ g/mL 併用時の MIC を、NCCLS (現 CLSI) 寒天平板希釈法に準じ⁹⁾、測定した。metallo- β -lactamase 産生株の判定は、MPA 併用時の CAZ の MIC が CAZ 単独の MIC よりも 8 倍以上低下した場合、または、MPA 併用時の IPM の MIC が IPM 単独の MIC よりも 8 倍以上低下した場合を陽性とした。薬剤の測定濃度は 256 μ g/mL まで実施した。

3. 使用した metallo- β -lactamase 検出セットおよびその判定

下記の市販の metallo- β -lactamase 検出セット 3 種類を使用した。それぞれのセットの判定方法については、陰性も含めた詳細な判定基準は設けられていないので、Table 1 に示す判定基準を使用した。

その根拠を下記に示す。

1) ドライプレート ‘栄研’ DPD1 (DPD, 栄研化学)

菌体を滅菌生理食塩水に MacFarland 1 の濃度に調製し、0.025mL をミューラーヒントンプイヨン 12mL に加え接種用菌液とした。菌液接種後直ちに 35℃ で 16-20 時間培養を行った。

判定は、DPA 併用時の CAZ の MIC が CAZ 単独の MIC よりも 8 倍以上低下した場合、または、DPA 併用時の IPM の MIC が IPM 単独の MIC よりも 8 倍以上低下した場合を陽性とした。陽性と判定されなかったものについては、CAZ 単独の MIC が 64 μ g/mL を超え、DPA 併用時の MIC が 32 μ g/mL 以上の場合および IPM 単独の MIC が 32 μ g/mL を超え、DPA 併用時の MIC が 16 μ g/mL 以上の場合、MIC の低下が 8 倍以上であるかどうか判断できないので、判定不能とし、CAZ 64 μ g/mL 以下または IPM 32 μ g/mL 以下で、DPA 併用時の MIC の低下が 8 倍未満であった場合は陰性とした。Metallo- β -lactamase 産生株であっても IPM の MIC は高くない株が存在するため、IPM による陰性の結果は採用しないこととし、最終判定は、CAZ または IPM 陽性の場合、metallo- β -lactamase 産生株とし、CAZ 陰性かつ IPM が陽性でない場合を metallo- β -lactamase 非産生株とし、CAZ 判定不能かつ IPM が陽性でない場合は判定不能とした。

2) メタロ- β -ラクタマーゼ SMA ‘栄研’ (SMA, 栄研化学)

菌液は滅菌生理食塩水に MacFarland 0.5 の濃度に調製し、ミューラーヒントン寒天培地上に滅菌綿棒で均一に塗布した後ディスクを置き、35℃ で 16~18 時間培養を行った。判定は、MAA 含有ディスク近接時の CAZ または IPM の阻止円の長径が、CAZ または IPM 単独の阻止円径よりも 5mm 以上増大した場合を陽性とした。CAZ または IPM の阻止円形成が認めら

Table 1 The criteria of Metallo-β-lactamase production by different methods

Metallo-β-lactamase production	DPD		SMA		CIC		
	CAZ	IPM	CAZ	IPM	Test I	Test MBL	Test CVA
Positive	+	+, -, NA	+	+, -, NA	+	-	+
	-, NA	+	-, NA	+	-	-	-
Negative	-	-, NA	-	-, NA	+	+	-
Not assessable	NA	-	NA	-	+	+	+
	NA	NA	NA	NA			

+, positive; -, negative; NA, not assessable

See text about the criteria of each methods

DPD: Dry plate "Eiken DPD1"

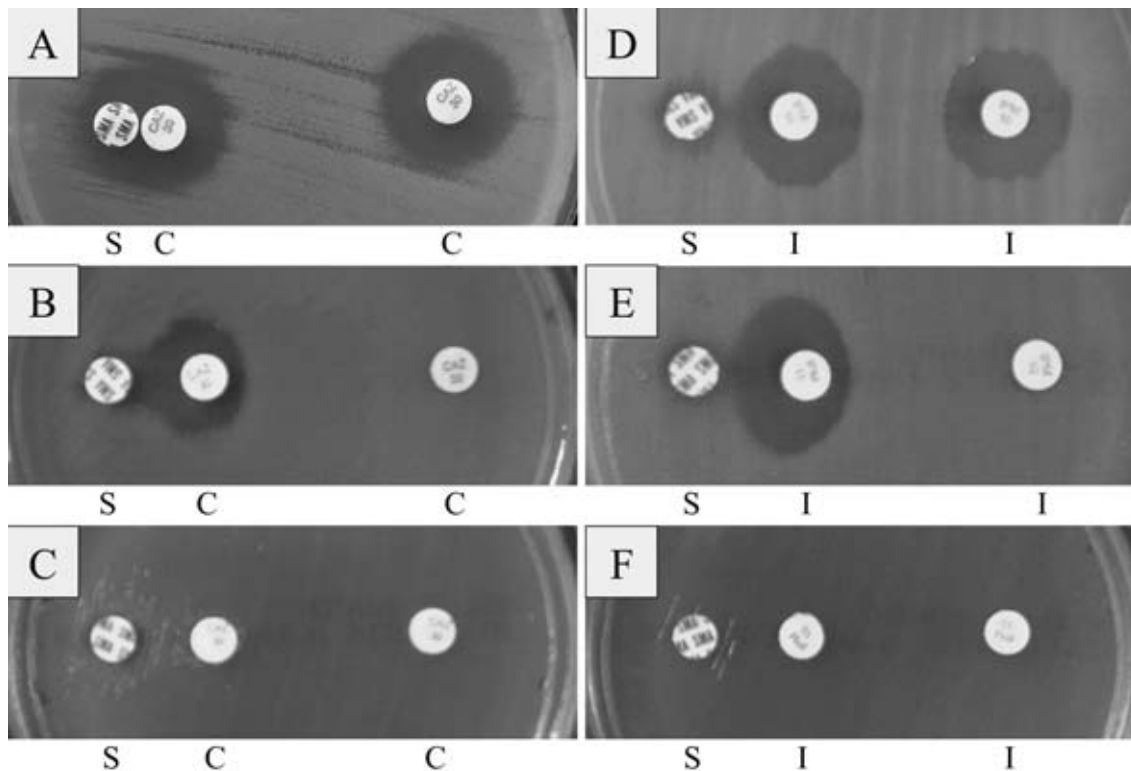
SMA: Metallo-β-lactamase "SMA Eiken"

CIC: Cica βTest

Fig. 1 Disk diffusion test using SMA disk.

S: 3 mg of mercaptoacetic acid; C: 30 μg of ceftazidime; I: 10 μg of imipenem.

A and D: non-metallo-β-lactamase producer, B, C, E and F: metallo-β-lactamase producer



れず (<6mm), MAA ディスク近接時の阻止円径の増大が5mm未満の時は、判定不能, CAZ または IPM 単独の阻止円形成が認められ (>6mm), MAA 併用時の阻止円径の増大が5mm未満の場合は陰性とした。最終判定は, CAZ または IPM のいずれかが陽性と判定されたものを metallo-β-lactamase 産生株とし, CAZ が陰性かつ IPM が陽性でない場合を metallo-β-lactamase 非産生株とし, その他は判定不能とした (Fig. 1). DPD と同様の理由により, IPM の陰性結果は採用しなかった。

3) シカバータテスト I/MBL (CIC, 関東化学)

平成18年7月20日

塗布する菌量については添付文章中に特に記載はないが, 過剰になると擬陽性となり, 少なすぎると偽陰性となる可能性があるため, 定量白金耳の1μLを用い, 1白金耳の菌量を採取しろ紙面全体に塗布した。塗布後, 室温に放置し15分後に判定を行った。

判定は, テストIに菌を塗布し, 15分以内に変化が認められないものを metallo-β-lactamase 非産生株, テストIが赤変し, テスト MBL では赤変せず変化が認められなかった場合を, metallo-β-lactamase が MBL により阻害を受けたと判断されるため, metallo-β-lactamase 産生株とした。また, テストIが赤変し,

Table 2 Results of metallo- β -lactamase detection by different methods

Methods	No. of strain			No. of strain identified as MBL-producer (%)
	Positive	Negative	Not assesable	
<i>Pseudomonas spp.</i>				
PCR positive (n = 38, IMP-1 : 37, IMP-2 : 1)				
CIC	38	0	0	38 (100)
SMA				
CAZ	36	0	2	37 (97.5)
IPM	24	2	12	
DPD				
CAZ	37	0	1	38 (100)
IPM	30	8	0	
Agar dilution				
CAZ	38	0	0	38 (100)
IPM	17	21	0	
PCR negative (n = 8)				
CIC	0	8	0	0 (0)
SMA				
CAZ	0	1	7	0 (0)
IPM	0	3	5	
DPD				
CAZ	0	3	5	0 (0)
IPM	0	4	4	
Agar dilution				
CAZ	0	8	0	0 (0)
IPM	0	8	0	
<i>Escherichia coli</i>				
PCR positive (n = 3, IMP-1 : 3)				
CIC	3	0	0	3 (100)
SMA				
CAZ	3	0	0	3 (100)
IPM	3	0	0	
DPD				
CAZ	3	0	0	3 (100)
IPM	0	3	0	
Agar dilution				
CAZ	3	0	0	3 (100)
IPM	0	3	0	

See text about the criteria of each method.

DPD : Dry plate "Eiken DPD1"

SMA : Metallo- β -lactamase "SMA Eiken"CIC : Cica β Test

テスト MBL も赤変した場合は、さらにテスト CVA を用い、陰性であった場合は、ESBL (基質特異性拡張型 β -lactamase) 産生株と考え、metallo- β -lactamase 非産生株とした。また、すべてが赤変した場合は、塗布する菌体量を減らして再試験を行い、それでもいずれも陽性であった場合は、判定不能とした。ただし、テスト I およびテスト MBL の両方が赤変した場合でもその変色の度合いに明らかな違い (テスト MBL で赤変が少ない) が認められたときは、metallo- β -lactamase 産生株と判定した。テスト MBL は、阻害剤含有により、metallo- β -lactamase の影響を阻止するものであり、酵素量が過剰であれば、阻害剤を含有していても、多少の HMRZ が分解され、赤変する可能

性があるからである。

結 果

PCR, SMA, CIC, DPD および MPA を用いた寒天平板希釈法による metallo- β -lactamase の判定結果を Table 2 に示す。IMP-1 または IMP-2 産生 *Pseudomonas spp.* は SMA ディスクと CAZ ディスクとの近接によって 38 株中 36 株 (94.7%), IPM ディスクでは 24 株 (63.2%) が陽性と判定され 2 つの薬剤のいずれかの併用効果が認められたものは、37 株 (97.4%) であった。Rpa 2821 株は両方の薬剤ともに MAA 含有ディスクの併用の有無にかかわらず阻止円は認められず判定不能であった。シカベータテストでは、Rpa 1871 株のみテスト I およびテスト MBL の両方とも赤

Table 3 The raw data of strains that the results of ceftazidime or imipenem was not assessable when Dry plate “Eiken DPD1” was performed

PCR	CIC	SMA						DPD					Agar dilution					
		Zone diameter (mm)				Result	MIC (µg/mL)				Result	MIC (µg/mL)				Result		
		CAZ	CAZ	IPM	IPM		CAZ	CAZ	IPM	IPM		CAZ	CAZ	IPM	IPM			
			+ MAA		+ MAA			+ DPA		/ DPA			+ MPA		/ MPA		+ MPA	
<i>P.aeruginosa</i>																		
Rpa 812	-	-	≤ 6 *	10	≤ 6	≤ 6	NA **	64	16	> 32	> 8	-	128	32	128	256	-	
Rpa1478	-	-	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	NA	> 64	> 16	> 32	> 8	NA	256	128	64	128	-	
Rpa1729	-	-	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	NA	> 64	> 16	> 32	> 8	NA	128	64	128	256	-	
Rpa1878	-	-	≤ 6	≤ 6	8	≤ 6	NA	> 64	> 16	32	> 8	NA	128	128	32	64	-	
Rpa3606	-	-	≤ 6	≤ 6	9	9	NA	> 64	> 16	16	4	NA	256	128	32	64	-	
Rpa3609	-	-	≤ 6	≤ 6	10	10	NA	> 64	> 16	16	8	NA	256	128	32	64	-	
Rpa4227	-	-	≤ 6	8	8	8	NA	64	16	16	4	-	256	64	16	32	-	
Rpa1229	+	(IMP-1)	+	≤ 6	≤ 6	≤ 6	11	+	> 64	> 16	> 32	4	+	> 256	64	128	32	+
Rpa2821	+	(IMP-1)	+	≤ 6	≤ 6	≤ 6	NA	> 64	16	> 32	8	+	> 256	64	> 256	64	+	

DPD : Dry plate “Eiken DPD1”

SMA : Metallo-β-lactamase “SMA Eiken”

CIC : Cica βTest

CAZ, ceftazidime ; DPA, dipicollic acid ; IPM, imipenem ; MPA, 2-mercaptopropionic acid ; MAA, mercaptoacetic acid

* : no inhibitory zone

** : not assessable

変が認められ、テスト CVA でも赤変を認めたが、その変色の度合いは明らかにテスト MBL で少なく、metallo-β-lactamase 産生株と判定できた。その他の株は、テスト I のみ陽性と判定され、全株 metallo-β-lactamase 産生株と判定できた。DPD では CAZ で 38 株中 37 株 (97.4%)、IPM では 30 株 (78.9%) が陽性となった。CAZ で判定不能となった 1 株は、IPM では陽性と判定され、DPD により全株 metallo-β-lactamase 産生株と判定された。寒天平板希釈法では CAZ および IPM の最高濃度を 256μg/ml としているため、MPA と CAZ との併用ですべて陽性と判定可能であり、IPM では 17 株 (44.7%) が陽性その他は陰性と判定された。

E. coli 3 株は CAZ により、SMA、DPD とともに陽性と判定されたが、DPD の IPM では単独の MIC が 1μg/mL 以下と低いため阻害剤の併用にかかわらず MIC の低下は認められず陰性と判定された。CIC では 3 株とも陽性と判定された。

metallo-β-lactamase 非産生 CAZ 耐性 8 株では SMA で、1 株 metallo-β-lactamase 非産生株と判定できたが、7 株は判定不能、DPD で、3 株非産生株と判定できたが、5 株判定不能となり、CIC ではすべてが陰性となった。また CAZ 256μg/mL まで測定した寒天平板希釈法では、すべてが陰性と判定できた。

SMA または DPD での CAZ の結果が判定不能となった 9 株の結果を Table 3 に示す。判定不能の理由は、CAZ の MIC が高いため、SMA では阻害剤を併用した場合でも阻止円が形成されないかわずかである、DPD では、測定範囲を超えてしまうため、阻害

剤の効果をみるできないことであった。Rpa 1229 株は、SMA および DPD とともに CAZ では判定不能であったが、IPM で metallo-β-lactamase 産生株であると判定可能であった。これらの株は、最高濃度 256 μg/mL まで測定した MPA と CAZ の併用試験により、すべて、相乗作用の有無を判定可能であった。いずれの方法でも、偽陰性、偽陽性を示す株は、存在しなかった。

考 察

本検討で用いた Metallo-β-lactamase は、PCR により、IMP-1 陽性 38 株、IMP-2 陽性 1 株である。IMP-1 の PCR primer は、melting temperature を forward 側と reverse 側で揃えるため、Senda ら¹⁰⁾ の primer と 1 塩基異なる場所に設定している。これまでにひびき臨床微生物研究会共同研究にて、この primer を用いて 400 株以上の CAZ 耐性株から、IMP-1 陽性株を検出しているが、阻害剤併用により、metallo-β-lactamase 陽性と判定された株は、IMP-2 産生株および *Stenotrophomonas maltophilia* や *Chryseobacterium* 属などの染色体上に Metallo-β-lactamase を有している株以外は、すべて、IMP-1 陽性株であった。

Goto ら⁵⁾ により、各種メルカプト化合物が metallo-β-lactamase の特異的阻害剤であることが報告され、Arakawa ら¹¹⁾ により、MPA ディスクと CAZ ディスクとを隣接して使用することにより、metallo-β-lactamase を検出することが可能であることが報告された。メルカプト化合物のメルカプト基が metallo-β-lactamase の酵素活性の主体となる亜鉛と結合することにより、加水分解活性を阻害するものであり、serine

β -lactamase である class A, class C, class D β -lactamase の活性は阻害しない。さらに栄研化学により改良されてメルカプト化合物として乾燥ディスク中で安定であり、かつ酵素活性を阻害する濃度で、細菌に対して発育阻害の少ない MAA を使用した製品 SMA が開発された。SMA は今回使用した metallo- β -lactamase 陽性 41 株中 CAZ と併用することにより、39 株 (95%) が検出可能であり、さらに IPM との併用試験を追加することにより、40 株 (97.6%) 検出することが可能であった。検出できなかった 1 株も判定不能株であり、偽陰性となった株は存在しなかった。また、metallo- β -lactamase 非産生 CAZ 耐性株では、高度耐性株を用いたため判定不能となる株が多くを占めたが、偽陽性となる株は認められなかった。判定不能となった株は、CAZ 単独でいずれも阻止円は認められず、MAA 含有ディスクと近接した場合の阻止円の増大が 5mm 未満の株であった。これは、市販ディスクの CAZ の含有量が 30 μ g であるため、class C β -lactamase を同時に大量に産生している株では阻止円の形成が認められないためであり、SMA の限界であると考えられた。寒天平板希釈により、CAZ の MIC を 256 μ g/mL まで測定したところ、阻害剤との併用により、MIC の低下を確認可能であったため、CAZ の含有量が 10 倍程度のディスクを使用すれば、検出可能であるが、このようなディスクの市販は現実的ではない。

DPA はキレート形成試薬であり、メルカプト化合物と同様 metallo- β -lactamase の亜鉛を奪うことにより、酵素活性を阻害する。ドライプレート '栄研' DPD 1 は、CAZ および IPM 単独および DPA 400 μ g/mL ずつ添加したものの MIC を比較し、3 管以上低下するものを metallo- β -lactamase 産生株と判定するものである。今回使用した metallo- β -lactamase 陽性 41 株中 CAZ と併用することにより、40 株 (97.6%) が検出可能であり、さらに IPM との併用試験を追加することにより、全株 (100%) 検出することが可能であった。metallo- β -lactamase 非産生 CAZ 高度耐性株では、判定不能となる株が多くを占めたが、偽陽性となる株は認められなかった。判定不能となった株は、CAZ 単独の MIC が $>64\mu$ g/mL、CAZ と DPA 併用した場合の MIC が $>16\mu$ g/mL であった株であった。これらの株の寒天平板希釈法による CAZ の MIC は、128-256 μ g/mL であり、CAZ の最高濃度を上げることにより、metallo- β -lactamase 陰性と判定することが可能であった。metallo- β -lactamase は、carbapenem 系抗菌薬である IPM を分解可能であるが、IPM は菌体内透過速度が速い¹²⁾ため、なんら透過障害がない場合は、たとえ metallo- β -lactamase 産生株であっても

MIC はほとんど上昇しない。事実 IMP-1 産生 *E. coli* 3 株に対する IPM の MIC は 1 μ g/mL 以下であり、*P. aeruginosa* でも 8 μ g/mL 以下を示す株が存在した。これらの株では、阻害剤を併用しても、MIC の低下や阻止円径の増大は少なく、metallo- β -lactamase 陰性と判定されてしまう可能性がある。したがって、IPM により、陽性と判定された株は、metallo- β -lactamase 保有株と考えられるが、陰性と判定された場合は、必ずしも metallo- β -lactamase 非産生株であるとは判定できない。CAZ は、metallo- β -lactamase により効率よく分解されるため、陽性、陰性の判定は、すなわち metallo- β -lactamase 保有、非保有と考えられる。緑膿菌や腸内細菌科の菌種の多くは、染色体上に AmpC β -lactamase をコードする遺伝子を保有しており、また、TEM-1 に代表されるプラスミド性の Class A β -lactamase を産生する株が多い。これらの複数の β -lactamase 産生している株においても、Metallo- β -lactamase 産生株かどうかは院内感染対策上、検出し、報告する必要があると考える。むしろ、産生量には違いはあるものの AmpC β -lactamase を産生していない緑膿菌はほとんどいない。判定不能株は、AmpC β -lactamase が大量に産生されていると考えられ、AmpC β -lactamase 産生により CAZ の MIC が高くなっているため、CAZ の濃度を高くした寒天平板希釈法にて、ようやく確認が可能となったと考えられる。しかしながら、同時産生株で検出感度が下がらないようなキットが求められているので、今回の検討では、AmpC β -lactamase 大量産生株などの複数の β -lactamase を産生する株を含む CAZ 耐性株を用いて検討した。

シカベータテスト I/MBL はニトロ基を有する cephalosporin HMRZ-86¹³⁾ が基質試薬であり、この化合物は β -lactamase に非常に安定であるが、ESBL および metallo- β -lactamase で容易に加水分解され発色が起こることを利用したものである。シカベータテスト I には、HMRZ-86 が、シカベータテスト MBL にはさらに MAA が、シカベータテスト CVA には、clavulanic acid が添加されており、ESBL と metallo- β -lactamase の検出が可能である。今回使用した metallo- β -lactamase 陽性 41 株は、全株 (100%) 検出することが可能であった。metallo- β -lactamase 非産生 CAZ 高度耐性株では、すべて陰性となり、感度、特異度とも 100% であった。Metallo- β -lactamase および ESBL 同時産生株では判定不能となると考えられるが、今回は存在しなかった。偽陽性を示した株は存在しなかったが、metallo- β -lactamase 産生量の多い株では、MAA が含有されている場合でもわずかに赤色に変化するものが存在したが、阻害剤非含有の場合と比較すると明

らかに差を認めたため、metallo- β -lactamase 陽性であるとの判定は可能であった。しかしながら、塗布する菌体の量が少ないと基質を分解せず偽陰性になる可能性があり、また、菌体の量が過剰であると、阻害剤含有の基質も分解してしまい、判定不能となる可能性があり、注意が必要であった。

Metallo- β -lactamase 産生性を疑うのは、CAZ などのセフェム系薬剤が高度耐性の場合であり、それ以外の株を陰性対照として用いる必要はないと考えたため、本検討は、metallo- β -lactamase 産生株を中心に実施し、非産生株は、*P. aeruginosa* 8 株のみを使用した。原理的にも、DPA, EDTA, SMA で偽陽性となるケースは考えられず、実験コストのことも考え、最小限とした。陰性対照とした株は、CAZ 高度耐性株ではあるが、偽陽性を示す株は、いずれの Kit においても存在せず、本検討の目的は十分果たしていると考ええる。他の菌種やプラスミド性の特殊な Class C β -lactamase を産生する株についての検討も価値があり、必要と考えるが、今後の検討課題であると考えている。

検討に用いた市販 3 種類の metallo- β -lactamase 確認セットはいずれも今回使用した metallo- β -lactamase 産生株の 97.6% 以上を検出可能であり、陰性、陽性、判定不能の定義を明確にしておけば、判定不能株は存在するものの、偽陰性、偽陽性は存在せず、非常に優れた方法であると考えられた。SMA は、ディスク拡散法という細菌検査室では慣れた手技を用いる方法であり、さらに安価であることを考慮するとルチンで実施可能な方法であると考えられる。また、ディスク法や微量液体希釈法では 16 時間以上を要するが、CIC は多少手技的に熟練を要するものの、わずか 15 分で判定が可能であり、迅速検査として有用性は高いと考えられた。また、CAZ 高度耐性株に対して、SMA や DPD では判定不能となる場合には CIC は有用である。また、一度 metallo- β -lactamase 産生株が分離された患者から、同一菌種が分離された場合の検査には CIC は有用であり、陽性であった場合は、感受性測定を省略できる場合もあると考えられる。

Metallo- β -lactamase 産生 *P. aeruginosa* は多剤耐性株であることが多く、今回使用した 33 株中 29 株 (87.9%) は、改正後の感染症法の 5 類感染症に指定されている薬剤耐性緑膿菌感染症の基準を満たす多剤耐性株であった。このような株では、有効な薬剤は存在せず、また、metallo- β -lactamase 遺伝子は多くの場合プラスミド上に存在するため、病原性の強い株へ伝播したり、異菌種へ伝播したりする可能性があり、病院内での伝播を防ぐことが最も重要である。そのためにも、これらの metallo- β -lactamase 検出セットを適

切に使用し、早期に報告することは細菌検査室として重要である。

文 献

- 1) Minami S, Akama M, Araki H, Watanabe Y, Narita H, Iyobe S, *et al.* : Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1996 ; 37 : 43—4.
- 2) Walsh TR : Related Articles, Links The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2005 ; 11 Suppl 6 : 2—9.
- 3) Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, *et al.* : PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrase carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 (12) : 5407—13.
- 4) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, *et al.* : Molecular characterization of an Enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 ; 38 : 71—8.
- 5) Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A : Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 (8) : 2755—9.
- 6) Goto M, Takahashi T, Yamashita F, Koreeda A, Mori H, Ohta M, *et al.* : Inhibition of the metallo-beta-lactamase produced from *Serratia marcescens* by thiol compounds. *Biol Pharm Bull* 1997 ; 20 : 1136—40.
- 7) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, *et al.* : Convenient test for screening metallo-beta-lactamase -producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 (1) : 40—3.
- 8) Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, *et al.* : Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 ; 44 : 891—7.
- 9) National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; Approved standard-Sixth edition, M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2003 ; 232 (2).
- 10) Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, *et al.* : PCR detection of met-

- allo-beta-lactamase gene (*blaIMP*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996 ; 34 : 2909—13.
- 11) Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, *et al.* : Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 : 40—3.
- 12) Yoshimura F, Nikaido H : Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1985 ; 27 : 84—92.
- 13) Hanaki H, Kubo R, Nakano T, Kurihara M, Sunagawa K : Characterization of HMRZ-86 : a novel chromogenic cephalosporin for the detection of extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2004 ; 53 : 888—9.

Comparison of 3 Commercial Metallo- β -lactamase Detection Kits

Masayuki SHIGETAKA¹⁾²⁾, Tetsuro MURATANI²⁾³⁾, Tomoko KOBAYASHI²⁾⁴⁾
Kohei OHKUBO²⁾ & Tetsuro MATSUMOTO³⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Chikuhō-Rosai Hospital, ²⁾Hibiki Research Group for Clinical Microbiology, ³⁾Department of Urology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, ⁴⁾Kyurin Corporation

Using 41 metallo- β -lactamase producing isolates and 8 metallo- β -lactamase nonproducing and ceftazidime-resistant isolates from Kyushu Island, metallo- β -lactamase was detected by 3 commercial metallo- β -lactamase detection kits, which were Metallo- β -lactamase SMA Eiken (SMA, disk diffusion, Eiken Chemical Co.), dry plate Eiken DPD1 (DPD, two-fold serial broth microdilution, Eiken Chemical Co.) and Cica β test I/MBL (CIC, coloring reaction, Kanto Chemical Co.). Detection rate by SMA, DPD, and CIC was 97.5, 100, and 100%. Neither method used in this study produced false-positive or false-negative results. The rates of metallo- β -lactamase nonproducer identification were 37.5%, 62.5%, and 100% for the SMA, DPD, and CIC kits, respectively.

These three methods have the following features, SMA is useful for routine work because SMA utilizes disk diffusion, which is widely used by medical technologists, and it is the least expensive of the three kits. CIC can detect metallo- β -lactamase after only 15 minutes and can determine the presence of non-metallo- β -lactamase producers at a high rate. DPD can simultaneously identify the MIC of some agents. Consequently these three metallo- β -lactamase detection kits were very useful for detecting metallo- β -lactamase producing isolates.