

主論文の要旨

**Practical Agar-Based Disk Diffusion Tests Using  
Sulfamoyl Heteroarylcarboxylic Acids for Identification  
of Subclass B1 Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing  
*Enterobacteriales***

Sulfamoyl Heteroarylcarboxylic Acids を用いたサブクラス B1  
メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生腸内細菌目細菌の  
ディスク拡散検出法の構築

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
微生物・免疫学講座 分子病原細菌学分野

(指導：柴山 恵吾 教授)

法月 千尋

## 【緒言】

カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (Carbapenemase-producing *Enterobacterales*: CPE) はグラム陰性桿菌による感染症の治療に用いられるカルバペネム系抗菌薬に耐性を示すため、現在世界的に問題になっている薬剤耐性菌である。カルバペネマーゼにはセリン型 (Serine-type  $\beta$ -lactamase; S $\beta$ L) とメタロ型 (Metallo-type  $\beta$ -lactamase; M $\beta$ L) があり、M $\beta$ L はさらに活性中心付近の構成アミノ酸の差異から、サブクラス B1、B2、B3 に細分される。国内ではサブクラス B1 M $\beta$ L を産生する CPE が多い背景から、その簡易検出法が必要であるとされている。そこで、本研究では、所属研究室が開発したサブクラス B1 M $\beta$ L に特異的な阻害剤 sulfamoyl heteroarylcarboxylic acids (SHCs) である 2,5-dimethyl-4-sulfamoylfuran-3-carboxylic acid (SFC) および 2,5-diethyl-1-methyl-4-sulfamoylpyrrole-3-carboxylic acid (SPC) を用い、サブクラス B1 M $\beta$ L 産生腸内細菌目細菌のスクリーニング検査法を構築した。

## 【方法】

M $\beta$ L 産生菌 65 株 (うちサブクラス B1 M $\beta$ L 産生菌は 64 株)、S $\beta$ L 産生菌 54 株、およびカルバペネマーゼ非産生カルバペネム耐性菌 9 株の合計 128 株を使用した。サブクラス B1 M $\beta$ L 産生菌として IMP、NDM、VIM 型 M $\beta$ L 産生菌を、サブクラス B3 M $\beta$ L 産生菌として SMB 型 M $\beta$ L 産生菌を、セリン型カルバペネマーゼ産生菌として KPC、GES、OXA、SME、NMC-A 型カルバペネマーゼ産生菌を用いた。SFC と SPC の 2 種類のサブクラス B1 M $\beta$ L 阻害剤を用い、微生物検査室で日常的に行われている ① double-disk synergy test (DDST)、② disk potentiation test、③ modified carbapenem inactivation method (mCIM) の 3 法について、それぞれ感度・特異度を算出した。3 法は以下のように行った。

### ① DDST

McFarland 0.5 に調整した菌液を Mueller-Hinton II 寒天培地に接種し、meropenem (MPM) ディスクの隣に SMA、SFC、SPC のそれぞれの阻害剤を含むディスクを配置し一夜培養後、発育阻止帯の拡大が確認されたものを陽性と判定した。

### ② Disk potentiation test

DDST と同様に菌液を接種し、MPM ディスクに阻害剤を滴下、一夜培養した後、MPM ディスク周囲の発育阻止円径と阻害剤含有 MPM ディスク周囲の発育阻止円径の差が 7mm 以上の場合、陽性と判定した。

### ③ mCIM

Mueller-Hinton II broth (MH-broth) に MPM ディスク、阻害剤を滴下し、35°C で 4 時間培養した。大腸菌 ATCC 25922 を接種した寒天培地に、MH-broth から回収したディスクを配置し一夜培養後、発育阻止円径を測定した。阻害剤滴下 MH-broth から回収したディスク周囲の発育阻止円径と阻害剤非滴下 MH-broth から回収したディスク周囲の発育阻止円径の差が 5mm 以上の場合、陽性と判定した。

## 【結果と考察】

SFCおよびSPCを用いたDDSTとmCIMにおいて、それぞれ高い感度 [95.3%(61/64)] でサブクラス B1 MβL 産生株を検出することができた。偽陰性となった菌株は NDM 型と OXA 型を共産生する 3 株であった。また、これらの試験において、サブクラス B1 MβL 以外のカルバペネマーゼ(サブクラス B3 MβL および SβL)を産生する菌株に対しては、陰性反応が確認され、特異度は 100%(55/55)となった。

Disk potentiation test においては、SPC(60/64, 93.8%)は SFC(57/64, 89.1%)に比べ高感度を示した。2つの阻害剤の感度の差は VIM 産生株の検出率の差によるものであり、SFC では 3 株の VIM 産生菌で偽陰性となった。特異度は SFC、SPC いずれも 100%(55/55)であった。なお、カルバペネマーゼ非産生カルバペネム耐性菌は 3 法すべてにおいて陰性であった。

国内では MβL 産生菌検出の際に用いる阻害剤として sodium mercaptoacetate(SMA)が使用されてきたが、NDM 産生株の検出率が低いことが度々問題視されていた。今回検討した SFC や SPC は、SMA よりも高い感度で NDM 産生株を検出することを可能とした。

今回、SFC および SPC を使用し検討した 3 法すべてにおいて、NDM および OXA の共産生株、すなわち、サブクラス B1 MβL と SβL 両方のカルバペネマーゼを産生する菌株を検出することができなかった。現在のところ、このような共産生株が分離されることは極めて稀であるが、今後、これらを識別するためには、新たに OXA 型カルバペネマーゼに対する阻害剤を開発し、検査法を構築する必要があると考えられる。

## 【結論】

今回新たに構築したサブクラス B1 MβL 産生株の鑑別試験法は、高感度、安価、簡便であるため、微生物検査室における日常検査として導入することが可能である。本検査法の導入により、CPE 感染症に対する感染制御の向上および適正な抗菌薬の選択に貢献することが期待できる。