

筑波大学

博士（医学）学位論文

基質拡張型 β ラクターマーゼ産生 *Proteus*
mirabilis による菌血症の臨床的特徴
および分離株の微生物学的解析

2 0 1 3

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

栗 原 陽 子

論文概要

目的

Proteus mirabilis は、腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、複雑性尿路感染症などを引き起こす。元来多くの抗菌薬に感性を示す菌だが、近年、基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) を産生する株が出現している。ESBL は、多くの β ラクタム系抗菌薬を分解する酵素で、これを産生する細菌の感染症では、治療に有効な抗菌薬が限定される。このため、ESBL 産生菌は、公衆衛生上重要な多剤耐性菌と考えられおり、既に大腸菌、クレブジエラ、緑膿菌などの菌については、ESBL 産生株に関するさまざまな研究が報告されている。しかし、*P. mirabilis* については、ESBL 産生株による感染症の疫学調査がほとんどない。このため、本研究では、茨城県南地区で起こった *P. mirabilis* 菌血症を調査し、ESBL 産生株の微生物学的特徴と、それによる菌血症の臨床的特徴を調べた。

対象と方法

茨城県南地区の 6 病院で、2001 年から 2010 年に起こった *P. mirabilis* 菌血症を調査した。分離した株は、Clinical and Laboratory Standards Institute の基準に従い、薬剤感受性の測定と ESBL 産生の有無の判定を行った。ESBL 産生株については、 β ラクタマーゼ遺伝子の同定およびパルスフィールドゲル電気泳動によるジェノタイ

ピングを行った。 *P. mirabilis* 菌血症を起こした患者の臨床情報は、診療録を後ろ向きに調べて収集した。

結 果

10年間の調査で、64例の *P. mirabilis* 菌血症を認めた。そのうち、13例で ESBL 産生株を分離した（入院100万件あたり9.5例）。これらの株は、全て *bla*_{CTX-M-2} グループの ESBL 遺伝子を保有していたが、ジェノタイプが完全に一致したものはなかった（類似するバンドパターンを示す株は2株あった）。また、ESBL 非産生株に比べ、アンピシリン/スルバクタムおよびシプロフロキサシンに耐性を示す株が有意に多かった（それぞれ $p=0.0011$ および $p<0.001$ ）。ESBL 産生株による菌血症は、ESBL 非産生株によるものと比べ、院内発症（ $p=0.030$ ）、透析（ $p=0.030$ ）、1ヶ月以内の抗菌薬使用（ $p=0.036$ 、特にペニシリンあるいはセファロスポリン [$p=0.010$]、フルオロキノロン [$p=0.0069$]）と有意に関連していた。ESBL 産生株の分離は、発症1日目および4日目に有効な抗菌薬を投与されていないことと関連していた（それぞれ $p=0.011$ および 0.032 ）が、30日目の死亡率とは有意な関連がなかった。

考 察

本研究で分離した ESBL 産生 *P. mirabilis* は、全て同じタイプの ESBL 産生遺伝子を保有していたが、ほとんどの株が異なるジェノタイプを示した。このことから、本研究で調査した ESBL 産生 *P. mirabilis* のほとんどは、特定の株が拡散しているの

ではなく、様々な株が他の菌から独自に ESBL 産生遺伝子を獲得し、ESBL 産生株になったと考えた。

本研究では、*P. mirabilis* 菌血症のうち ESBL 産生株が原因となる危険因子を、3 つ明らかにした。これらの危険因子は、該当患者が ESBL 産生菌の伝播・保菌を起こしやすい状態・状況にあったことを示唆しており、その結果、菌血症の発症との関連が高くなったと考える。また、ESBL 産生株を分離した症例では、初期治療時に有効でない抗菌薬を投与された例が多かったものの、患者の死亡率には差がなかった。このことは、*P. mirabilis* 菌血症において、カルバペネムなどの ESBL 産生菌に有効な広域抗菌薬の投与は、分離菌の薬剤感受性が判明してから開始しても患者の転帰に影響を与えない可能性を示すと考えた。

本研究での *P. mirabilis* 菌血症の発生頻度は、国外での先行研究よりかなり低かった。このため、10 年間症例を収集したが、多変量解析を行うには症例数が足りないと考えた。今後、該当する症例数を増やし、さらに詳細な解析を行う必要がある。

結 論

茨城県南地区でおこった ESBL 産生 *P. mirabilis* 菌血症の臨床的特徴とその分離株の微生物学的特徴を調査した。ESBL 産生株は、全て *bla*_{CTX-M-2} グループの ESBL 産生遺伝子を保有していたが、ほとんどが異なるジェノタイプを示し、起源が異なると考えた。また、ESBL 産生株は、非産生株と比べてアンピシリン/スルバクタムとシプロキサシンに耐性を示す株が多かった。ESBL 産生 *P. mirabilis* による菌血症は、非

産生株によるものと比べ、院内発症、透析、1ヶ月以内の抗菌薬使用と有意に関連していた。また、ESBL産生株の分離は、発症初期に有効な抗菌薬を投与できていないことと関連していたが、30日目の死亡率とは有意な関連がなく、広域抗菌薬の投与を薬剤感受性が判明するまで控えることが可能かもしれない。詳細な統計解析を行うために、今後も症例の蓄積が必要である。

目次

序文	1
<i>Proteus</i> 属について	1
<i>Proteus mirabilis</i> について	1
基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) について	2
ESBL 産生菌の疫学	3
ESBL と薬剤感受性試験	5
ESBL 産生 <i>P. mirabilis</i> による菌血症	6
本研究について	7
材料と実験方法	7
臨床情報の収集	7
臨床的特徴の定義	8
菌の同定と感受性, ESBL 産生の検出	8
ESBL 産生遺伝子の検出とタイピング	9
パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) によるジェノタイピング	9
統計学的解析	10

結 果	10
<i>Proteus mirabilis</i> 菌血症の臨床的特徴.....	10
分離株の薬剤感受性と ESBL 産生	11
ESBL 産生株の解析	12
ESBL 産生株と非産生株による菌血症の比較.....	12
考 察	13
参考文献.....	19
図 表	27

序 文

Proteus 属について

Proteus 属は，腸内細菌科に属する通性嫌気性グラム陰性桿菌で，ヒトや動物の腸管，土壌，汚染された水域に生息している．他の腸内細菌科の菌とは，ウレアーゼおよびフェニルアラニンデアミナーゼを産生すること，ゼラチンを加水分解すること，などの生化学的性状から区別することができる．特定の条件で培養すると，菌体の伸長や鞭毛数の増加がおこり，菌の形態が著しく変化する．これがギリシャ神話の変幻自在に姿を変える神を想起させることから，*Proteus* という名前が付いた (Donnenberg, 2005)．

Proteus mirabilis について

Proteus 属には，*Proteus mirabilis*，*Proteus vulgaris*，*Proteus penneri* の 3 種がある．このうち，最も病原性が高く菌血症を起こしやすいのは，*P. mirabilis* である (Adler *et al.*, 1971; Berger, 1985; Kim *et al.*, 2003)．この菌は，尿路感染症に伴う菌血症において，*Escherichia coli*，*Klebsiella* 属に次いで分離頻度が高い (Bishara *et al.*, 1997)．ただし，健常人に感染症を起こすことは少なく，長期の尿道カテーテル留置者など，腎泌尿器系に解剖学的，機能的異常を持つ患者で分離されることが多い (Abbott, 2007; Mobley & Belas, 1995)．他の *Proteus* 属の菌種とは，インドールを産生しないこと，オルニチンデカルボキシラーゼを産生すること，マルトースを分解しないことから区別できる (Farmer, 2007)．

P. mirabilis の病原性には、ウレアーゼの産生能や、菌体周囲の線毛、鞭毛が関与している。ウレアーゼにより尿中の尿素が加水分解されると、pH が上昇し、リン酸アンモニウムマグネシウムやリン酸カルシウムの結晶が析出する。析出した結晶は、尿路カテーテルに付着したり尿路結石の原因となり、尿の自然な流出を妨げ、尿路への菌の定着を増強する。また、菌体周囲の線毛および鞭毛は、膀胱上皮細胞への付着や腎臓への上行に大きく関わっている (Coker *et al.*, 2000)。

P. mirabilis は、本来テトラサイクリンを除く多くの抗菌薬に感性である。このため、この菌による尿路感染症には、通常 β ラクタム、アミノグリコシド、フルオロキノロン、ST 合剤などの多くの抗菌薬が有効である (O'Hara *et al.*, 2000)。しかし最近では、様々な薬剤耐性を獲得した *P. mirabilis* 株が、世界中で分離されるようになった。特に、基質拡張型 β ラクタマーゼ (extended-spectrum β -lactamase : ESBL) 産生株は、前述の抗菌薬を不活化することがあるため、临床上重要な耐性菌と考えられている (Sturenburg & Mack, 2003; Pitout & Laupland, 2008; Lautenbach *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008)。

基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) について

β ラクタマーゼは、 β ラクタム環を加水分解することによって、 β ラクタム系抗菌薬の抗菌活性を失活させる酵素である。Ambler らは、アミノ酸配列の相同性から β ラクタマーゼを、クラス A から D までの 4 系統に分類した (Ambler, 1980)。クラス A はペニシリン、クラス B はカルバペネム、クラス C はセファロスポリン、クラス

Dはオキサシリン（通常のペニシリナーゼでは分解できない）を含むペニシリンを加
水分解する。

ESBLとは、本来ペニシリンしか分解できないクラスAあるいはクラスDのβラ
クタマーゼにアミノ酸変異が生じ、セファロスポリンやモノバクタムも分解できるよ
うになったものである。βラクタムの中でも、セファマイシンやカルバペネムは分解
しない。また、クラブラン酸、スルバクタム、タゾバクタムなどのβラクタマーゼ阻
害剤により失活する（Paterson & Bonomo, 2005）。臨床分離株から検出することが
多いESBLは、クラスAに属するTEM型、SHV型、CTX-M型と呼ばれるもので
ある。TEM型およびSHV型ESBLは、それぞれTEM-1およびSHV-1と呼ばれる
βラクタマーゼに変異が生じたものである。CTX-M型ESBLは、*Kluyvera*属の染色
体上に存在するβラクタマーゼが起源であり、アミノ酸配列からCTX-M-1, CTX-M-2,
CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25の5グループに分類される（Bonnet, 2004）。これ
らのESBLをコードする遺伝子は、多くの場合伝達性プラスミド上に存在し、これを
介して他の菌株、菌種（主に腸内細菌やブドウ糖非発酵菌などのグラム陰性桿菌）に
水平伝播する（Sirot *et al.*, 1991）。

ESBL 産生菌の疫学

世界で最初のESBL産生菌は、1983年にドイツで報告された *Klebsiella*
pneumoniae および *Serratia marcescens* である（Knothe *et al.*, 1983）。その後、
ESBLを産生する腸内細菌の分離が、ヨーロッパを中心に相次いで報告されるように

なった。ESBL 産生菌が広まった理由の一つは、1960 年代にペニシリンや第 1 世代セファロスポリンを分解する β ラクタマーゼ産生菌が出現するようになったため (Datta & Kontomichalou, 1965; Medeiros, 1984), これらの菌に対してより有効な第 3 世代セファロスポリンが多用されるようになったことである。1980 年代後半になり, CTX-M 型 ESBL を産生する *E. coli* がドイツで分離された (Bauernfeind *et al.*, 1990). 1995 年以降は, この CTX-M 型 ESBL 産生菌の分離頻度が世界中で増加している (Bonnet, 2004).

現在 ESBL 産生菌の分離頻度が特に高いのは, アジアと南米である (Canton *et al.*, 2008). アジアの中では, 中国やインドで分離率が高い。2009 年に中国で行われたサーベイランスでは, *E. coli* の 56% および *K. pneumoniae* の 41% が (Wang *et al.*, 2011), 2002 年のインドの報告では, *E. coli* の 60% 以上が, ESBL を産生していた (Mathai *et al.*, 2002). 日本で最初に報告された ESBL 産生菌は, Toho-1 型 (現在 CTX-M-2 グループに分類されている) β ラクタマーゼを産生する *E. coli* である (Ishii *et al.*, 1995). 日本での ESBL 産生菌の分離頻度は, アジアの他の国より低く, 2006 年のサーベイランスでは, *E. coli* で 3.7%, *Klebsiella* 属で 2.7%, *Proteus* 属で 11.4% だった (Yoshida *et al.*, 2010).

ESBL 産生菌は, 患者の腸管内や留置カテーテルに定着し, 病院内で集団発生をおこすことがある。最初の集団発生事例は, ESBL 産生 *K. pneumoniae* が集中治療室内で広まった事例で (Lucet *et al.*, 1996), その後 ESBL 産生菌による院内感染事例が多数報告されている。これに対し, 近年は ESBL 産生菌による市中感染の報告も増

えており (Ben-Ami *et al.*, 2009), 特に CTX-M 型 ESBL を産生する *E. coli* による市中発症の尿路感染が問題になっている (Rodriguez-Bano *et al.*, 2006).

ESBL と薬剤感受性試験

グラム陰性桿菌のうち *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. mirabilis* については, ESBL を産生しているかどうかを判断する基準が, アメリカの Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) などから提唱されている (Kahlmeter, 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). この基準では, まず被験菌に対するセフトキシム, セフトジジム, セフトキシム, アズトレオナムのいずれかの最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) を測定し, それぞれ 2 µg/ml, 2 µg/ml, 8 µg/ml (*P. mirabilis* の場合 2 µg/ml), 2 µg/ml 以上だった場合, 確認試験を行う. 確認試験では, セフトジジムとセフトキシム, およびそれぞれの薬剤にクラブラン酸を 4 µg/ml 添加した場合の MIC 値を調べる. セフトジジムとセフトキシム単剤での MIC 値に比べ, クラブラン酸を添加した時の MIC 値が 1/8 以下に低下した場合, ESBL 産生株であると判断する. この基準は, 検査方法が簡便なことから, 臨床現場や様々な疫学研究で用いられている. しかし, 他の腸内細菌 (*Enterobacter*, *Morganella*, *Serratia* など) や緑膿菌では, クラブラン酸により他の β ラクタマーゼが誘導され, セフトジジムおよびセフトキシムの MIC 値が逆に上昇することがあるため, この基準を使うことができない.

ESBL産生株の薬剤感受性を一般的な方法で測定すると, ペニシリンやセファロス

ポリンなどに感性があると判定されることがある。これは、一部のESBLは、試験管内でのβラクタム分解能が低いため、そのESBLを産生する菌の試験管内での発育が、低濃度のβラクタムでも押さえられてしまうことによる。しかし、ESBL産生菌による感染症に対し、実際にペニシリンやセファロスポリンを投与すると、治療に失敗することが多い (Karas *et al.*, 1996; Paterson *et al.*, 2001)。このため、CLSIなどの基準では、ペニシリン、セファロスポリン、アズトレオナムについては、ESBL産生菌の場合、試験管内での検査結果に関わらず耐性と判定するよう薦めている (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007)。また、ESBL産生菌にβラクタマーゼ阻害剤配合薬やセファマイシンを投与すると、βラクタマーゼの過剰産生や外膜のポーリンの消失が誘導され、これらの薬剤の抗菌活性が低下することがある (Thomson & Moland, 2001; Pangon *et al.*, 1989)。加えて、ESBL産生菌では、フルオロキノロンなどβラクタム以外の抗菌薬にも同時に耐性を獲得していることが多い (Pitout *et al.*, 2004; Jacoby *et al.*, 2006)。これらの理由から、ESBL産生菌の重症感染症では、信頼できる治療薬としてカルバペネムを選択せざるをえないことが多い (Pitout & Laupland, 2008; Paterson & Bonomo, 2005)。

ESBL 産生 *P. mirabilis* による菌血症

今までに、*P. mirabilis* のうち ESBL を産生する株の分離率を調べた報告はいくつかある (Kanayama *et al.*, 2010; Ishikawa *et al.*, 2011)。しかし、ESBL 産生 *P. mirabilis* による感染症の臨床的特徴は、ほとんど調べられていない。イタリアの研

究で、25 例の *P. mirabilis* 菌血症（そのうち 11 例が ESBL 産生株による）を調査したものがある。この研究では、ESBL 産生株による菌血症は、介護施設への入所の既往および尿路カテーテルの使用と有意な関連を認め、死亡率が高かったと報告している（Endimiani *et al.*, 2005）。しかし、この研究は単一施設での症例しか分析していない。

本研究について

今まで述べてきたように、*P. mirabilis* は、尿路感染の起因菌として重要な病原体である。しかし、*E. coli* や *K. pneumoniae* などの他の腸内細菌と比べ、*P. mirabilis* では、ESBL 産生菌がどのような感染症をおこしているかを調べた研究は、今までほとんどない。そこで本研究では、*P. mirabilis* 菌血症の多施設サーベイランスを行い、菌血症をおこす ESBL 産生 *P. mirabilis* がどのような微生物学的特徴を持つのか、また、ESBL 産生 *P. mirabilis* による菌血症は ESBL 非産生株によるものと比べてどのような臨床的特徴を持つのか、を調べた。

材料と方法

臨床情報の収集

2001 年から 2010 年にかけて、茨城県南部で *P. mirabilis* 菌血症のサーベイランスを行った。当初は 2 カ所の大学病院と 1 カ所の地域中核病院でサーベイランスを開始

したが、2006年から2カ所の地域中核病院が追加参加した。これらの病院の2010年の総ベッド数は2,789床、総入院患者数は約750,000人だった。対象患者の診療記録から、年齢、性別、基礎疾患、治療歴、一次感染巣、危険因子、治療、予後などの臨床的特徴を後ろ向きに調査した。同一患者で*P. mirabilis*が繰り返し分離された場合は、最初の菌血症エピソードを調査対象とした。

臨床的特徴の定義

菌血症の一次感染巣は、臨床症状あるいは同時に提出された他の検体の培養結果から診断した。他の病院からの転院例や入院後48時間後に発症した場合は、病院内発症と定義した。菌血症の重症度は、American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicineの基準に沿って分類した (American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, 1992)。*P. mirabilis*の分離と同時あるいは24時間以内に他の微生物が血液から検出された場合は、「複数菌感染」とした。分離した*P. mirabilis*が感性を示す抗菌薬が少なくとも1種類投与されている場合、「有効な抗菌薬が投与された」とした。有効な抗菌薬が投与されたかどうかは、陽性になった血液培養が提出された日と検査結果がおおむね判明する3日後（それぞれ発症1日目、4日目）に評価した。*P. mirabilis*が同一患者から28日以上経過した後に再び血液より分離された場合、「再発」とした。患者の死亡は、最初に陽性となった血液培養が提出された日から30日後、あるいは菌血症を診断した病院から退院した時に評価した。

菌の同定と感受性, ESBL 産生の検出

血液培養は, 自動血液培養装置 BacT/Alert® 3D (日本ビオメリュー, 東京, 日本) または全自動血液培養検査装置 BACTEC™ (日本ベクトン・ディッキンソン, 東京, 日本) で行った. 分離した菌は, 各施設の検査室の通常業務に則って, グラム染色した後, MicroScanWalkAway System (Dade Behring, 東京, 日本), VITEK 2 グラム陰性菌用カード (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France), あるいは Enterotube® II (日本ベクトン・ディッキンソン, 福島, 日本) で同定した. *P. mirabilis* と同定された株は, 全て 10% スキムミルクに懸濁し, -85°C で保存した. 抗菌薬の MIC は, ドライプレート (栄研化学, 東京, 日本) を用いて測定し, CLSI の基準 (2007 年版) に従って判定した (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). ESBL 産生の有無は, Epsilometer test (Etest® ESBL CT/CTL および ESBL TZ/TZL ; アスカ純薬, 東京, 日本) を用いて確定した.

ESBL 産生遺伝子の検出とタイピング

ミューラーヒントン寒天培地上で一晩発育させた被験菌を, TE 緩衝液 (10 mM Tris-Cl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH=8.0) 200 µl に懸濁し, 10 分間煮沸した. 15,000 rpm で 10 分間遠心し, 上清 1 µl をテンプレートとして, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} 遺伝子を PCR 法で検出した. PCR の条件を表 1 に示す.

パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) によるジェノタイピング

被験菌をミューラーヒントン培地で一晩培養し、その培養液 100 μ l を遠心して、沈渣を PIV 緩衝液 (10 mM Tris-Cl [pH=8.0], 1 M NaCl) 100 μ l に懸濁した。等量の 2% 低融点アガロース (Cambrex Bio Science, Rockland, USA) とよく混和し、型に流しこんで 4°C で固形化した。作成したアガロースプラグは、lysis buffer (6 mM Tris-Cl, 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid [pH=8.0], 1 M NaCl, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% sodium *N*-lauroylsarcosinate, 0.5 mg/L Proteinase K [和光純薬工業, 大阪, 日本]) に浸し、50°C で 18 時間処理した。プラグの一部を TE 緩衝液で 4 回洗浄した後、制限酵素 *NotI* (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を含む反応液に浸漬して、37°C で一晩処理した。これを 1% の PFGE 用アガロースゲル (Pulsed Field Certified Agarose ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) に包埋し、CHEF DR-II System (Bio-Rad Laboratories) で泳動した。泳動条件は次の通りである ; 電場の強さ ; 6 V/cm, 泳動温度 ; 14°C, パルス時間および泳動時間 ; 1 - 30s で 5 時間泳動後 30 - 70s で 13 時間泳動。泳動終了後、アガロースゲルを臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下で DNA 断片を可視化した。

統計学的解析

カテゴリー変数はフィッシャーの直接確率検定で、連続変数はマン・ホイットニーの *U* 検定で解析し、*p* 値 < 0.05 (両側検定) の場合、統計学的に有意とした。

結 果

P. mirabilis 菌血症の臨床的特徴

10年間のサーベイランスで、64症例(入院100万件あたり9.5症例)の*P. mirabilis*菌血症を認めた(表2)。そのうち13例がESBL産生株によるものだった(表3)。最も多かった一次感染巣は泌尿器系(36例、56%)で、そのうち半数は尿路カテーテルが留置されていた。病院内発症は31例(48%)だった。31例(48%)で脳血管性病変、末梢神経病変、認知症などの神経疾患を認めた。18例(28%)で、菌血症を発症する1ヶ月以内に何らかの抗菌薬が投与されていた。菌血症の重症度は、26例が敗血症、11例が重症敗血症、27例が敗血性ショックだった。複数菌感染の症例で同時に分離した菌は、*Enterococcus* 属(8例)、*E. coli*(6例)、*Staphylococcus aureus*(3例)だった。

全ての患者が入院したが、3例で抗菌薬投与がなかった。残りの症例で最初の治療抗菌薬として投与されたのは、26例でペニシリンあるいはセファロスポリン

(PEN/CEP)、9例でβラクタマーゼ阻害剤配合PEN/CEP(PEN/CEP+BLI)、16例でカルバペネム、6例でセファマイシンあるいはオキサセフェム(CEM/OXC)、3例でアミノグリコシド、4例でフルオロキノロンだった。54例(83%)で適切な抗菌薬が発症1日目から投与されていた。発症4日目では、生存していた56例中、50例(88%)が適切な抗菌薬を投与されていた。再発は3例で認め、褥創に感染を繰り返して起こしたもの、膠原病に対しステロイド治療を行っていたもの、尿路結石を有して

いたもの、が1例ずつあった。死亡は20例（31%）だった。

分離株の薬剤感受性と ESBL 産生

全ての *P. mirabilis* 株（64 株）が、セフトラゾール、メロペネム、アミカシンに感受性だった。ゲンタミシン、アンピシリン/スルバクタムに対しては、ほとんどの株が感受性だったが、前者には ESBL 非産生株の 1 株が、後者には ESBL 産生株の 4 株が中等度耐性を示した（それぞれ MIC = 8 µg/ml, 16/8 µg/ml）。シプロフロキサシンに対しては、ESBL 産生株では 1 株（7.7%）、ESBL 非産生株では 40 株（78%）が感受性だった。ESBL 産生株のアンピシリン/スルバクタムおよびシプロフロキサシンに対する感性率は、非産生株に比べ有意に低かった（それぞれ $p=0.0011$ および $p<0.001$ ）（表 4）。

ESBL 産生株の解析

ESBL 産生 *P. mirabilis* による菌血症は、参加した全ての病院で、サーベイランス期間を通して起こっていた。分離した全ての株で *bla*_{CTX-M-2} グループ遺伝子が陽性で、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV} および他の *bla*_{CTX-M} 遺伝子は陰性だった。PFGE 解析では、異なる病院から分離した 2 株（図 1、レーン 3 と 4 の株）で、遺伝子断片のバンドパターンが類似していた（分子量の異なる遺伝子断片が 3 本以内、Tenover *et al.*, 1995）ものの、その他の株のバンドパターンは全く異なっていた。

ESBL 産生株と非産生株による菌血症の比較

ESBL産生株による菌血症は、非産生株によるものと比べ、院内発症 ($p=0.030$)、透析患者 ($p=0.0050$)、1ヶ月以内の何らかの抗菌薬投与 ($p=0.036$ 、特にPEN/CEP [$p=0.010$]、フルオロキノロン [$p=0.0069$])と有意に関連していた。また、ESBL産生株による菌血症では、発症1日目および4日目に有効な抗菌薬が投与されていない症例が有意に多かった(それぞれ $p=0.011$ および 0.032)。しかし、再発と死亡の頻度は、ESBL産生株による菌血症と非産生株による菌血症でほぼ同等だった(表4)。

考 察

本研究では、2010年までの10年間に、茨城県南地区の基幹病院で起こった64例の*P. mirabilis*菌血症を調査し、ESBL産生株がどのような微生物学的特徴を持っているか、また、ESBL産生株による菌血症はESBL非産生株によるものと比べどのような臨床的特徴があるか、について解析した。調査した64例中13例がESBL産生株によるもので、これらの株は全て $bla_{CTX-M-2}$ グループ遺伝子を保有していたが、ジェノタイプが完全に一致するものはなかった(類似しているものは2株あった)。また、ESBL産生株は、ESBL非産生株と比べ、アンピシリン/スルバクタムおよびフルオロキノロン系抗菌薬を代表するシプロフロキサシンに耐性を示すものが有意に多かった。ESBL産生株による菌血症の発症には、院内での発症、透析の既往、1ヶ月以内の抗菌薬の先行投与、の3つの因子が有意に関連していた。また、ESBL非産生

株によるものと比べ、発症 4 日目でも有効な抗菌薬を投与されている症例が有意に少なかったが、30 日後の死亡率はほぼ同等だった。

これまでの日本での調査によると、*P. mirabilis* のうち ESBL 産生株が占める割合は、調査地域や検査材料によって違うものの、12%から 37% (Kanayama *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2010; Ishikawa *et al.*, 2011) だった。また、ESBL 産生遺伝子を調査した報告によると、日本で分離される ESBL 産生 *P. mirabilis* のほとんどが *bla*_{CTX-M-2} グループ遺伝子を保有していた (Kanayama *et al.*, 2010)。本研究は、血液から分離した *P. mirabilis* のみを収集・解析したものだが、ESBL 産生株の比率が 20.3%、分離した全ての ESBL 産生株が *bla*_{CTX-M-2} グループ遺伝子を保有と、日本での先行調査とおおむね同じ結果だった。また、過去に ESBL 産生 *P. mirabilis* の施設内伝播事例が国内の施設で確認されている (Nagano *et al.*, 2003) ことから、本研究で分離した ESBL 産生株が同一起源に由来するものかどうかを、PFGE で解析した。その結果、類似したバンドパターンを示す株が少数あったものの、ほとんどの株はジェノタイプが異なっていた。このことは、本研究を行った地域・施設で菌血症をおこしていた ESBL 産生 *P. mirabilis* は、ほとんどが異なる起源に由来する株であり、特定の ESBL 産生株が地域に拡散して菌血症をおこしているわけではないことを示す。*bla*_{CTX-M-2} グループ遺伝子は、日本の ESBL 産生グラム陰性桿菌からよく検出される遺伝子である (Shibata *et al.*, 2006)。よって、本研究で分離した ESBL 産生 *P. mirabilis* のほとんどは、*bla*_{CTX-M-2} グループ遺伝子を持つ他の ESBL 産生グラム陰性桿菌から、それぞれ独自にプラスミドを取得して ESBL 産生株になったと考える。本

研究では、ESBL 産生 *P. mirabilis* 菌血症を発症した患者が、他にどのような ESBL 産生菌を保菌していたかは調査していない。*P. mirabilis* がどのように ESBL 産生遺伝子を保有するのか、なぜ日本の ESBL 産生 *P. mirabilis* は *bla*_{CTX-M-2} グループ以外の ESBL 産生遺伝子を持つことが少ないのかについては、今後の検討が必要である。

ESBL 産生菌による感染・保菌の危険因子については、*P. mirabilis* 以外のグラム陰性桿菌による感染症や集団発生の研究で、繰り返し調べられている (Paterson & Bonomo, 2005; Sturenburg & Mack, 2003)。今までの研究で危険因子にあがっているのは、長期間の入院、侵襲的な医療行為、頻回の抗菌薬投与などに関係する因子である。これらの因子を持つ患者は、耐性菌が水平伝播しやすい環境に長時間曝されている、医療器具の留置や抗菌薬投与により常在細菌叢に乱れが生じている、免疫不全状態にある、といった耐性菌が定着しやすい状況におかれている。耐性菌が定着している確率が高い患者群では、その菌による感染症を起こす可能性も高まる。本研究で ESBL 産生 *P. mirabilis* 菌血症の発症と関連があった 3 つの危険因子も、ESBL 産生菌を保菌しやすい条件に当てはまるものであり、その結果、菌血症の発症とも関連が生じたと考える。これら 3 つの危険因子が、それぞれどの程度 ESBL 産生株による菌血症の発症に寄与しているのかを知るためには、多変量解析を行う必要がある。しかし、本研究では解析に十分な症例数が集まらなかったと考えた。

本研究で発症前 1 ヶ月以内に先行投与された抗菌薬の種類を調べてみると、βラクタム系抗菌薬である PEN/CEP だけでなく、シプロフロキサシンに代表されるフルオロキノロンも ESBL 産生株による菌血症と関連があった。分離された ESBL 産生株

は1株を除きシプロフロキサシン耐性で、逆に ESBL 非産生株ではシプロフロキサシン感性株が約 80%を占めた。今までの報告でも、ESBL を産生する *P. mirabilis* はしばしば同時にフルオロキノロンにも耐性を獲得していることが示されており

(Sohn *et al.*, 2011; Tumbarello *et al.*, 2007), フルオロキノロンの先行投与がフルオロキノロン耐性のみならず ESBL を産生する株も選択してしまう可能性がある。ただし、本研究でフルオロキノロンの先行投与があった3例のうち、2例では PEN/CEP の先行投与もあり、フルオロキノロンだけが先行投与されたのは1例だけだった。したがって、フルオロキノロンの先行投与が ESBL 産生 *P. mirabilis* による菌血症を発症させる真の危険因子であるかどうか、今後フルオロキノロンのみを先行投与された症例を集めて調査する必要がある。

ESBL 産生腸内細菌感染症に関わる今までの研究では、重症感染症に対して適切な抗菌薬投与が遅れた場合死亡率が上昇した、という報告が多い (Tumbarello *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2002; Anderson *et al.* 2006)。これに対し本研究では、発症4日目に有効な抗菌薬が投与されていた症例が、ESBL 産生株を分離した症例で有意に少なかったのにも関わらず、30日目の死亡率は、ESBL 非産生株を分離した症例との間に有意な差を認めなかった。本研究と同様の結果は、シプロフロキサシン耐性 *P. mirabilis* による菌血症を調査し、有効抗菌薬投与の有無と転帰を調べた他の研究 (Sohn *et al.*, 2011) でも報告されている。また、128例の ESBL 産生 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* による菌血症を調査した研究によると、抗菌薬投与が適切だったグループと不適切だったグループの第21病日の死亡率は、それぞれ 14.9%

と 35.2%だったものの統計学的な有意差はなく、最も死亡に関与していたのは敗血症の重症度だった (De Rosa *et al.*, 2011) . 同じ腸内細菌科に属する *E. coli* や *K. pneumoniae* と比べ、*P. mirabilis* は健常人に感染症をおこしにくいことから、この菌の病原性は、*E. coli* や *K. pneumoniae* より低いと考えられる. したがって、*P. mirabilis* による菌血症では、*E. coli* や *K. pneumoniae* によるものと比べ、発症後の病状の進行が遅く、有効抗菌薬投与の遅れが数日間程度であれば転帰に影響しないのかもしれない. グラム陰性桿菌による感染症を疑う患者の治療にあたっては、起因菌の薬剤感受性が判明するまで、ESBL 産生株が原因かどうかを確実に予測することはできない. このため、治療開始時点では、耐性菌が原因である可能性を考慮し、カルバペネムなどのスペクトラムの広い抗菌薬を投与する場合もある. しかし、適切な抗菌薬投与が数日間遅れても転帰に影響しないのであれば、起因菌の薬剤感受性が判明してから必要に応じて広域抗菌薬投与を開始することで、広域抗菌薬の使用を減らすことができるかもしれない.

本研究での *P. mirabilis* 菌血症の頻度は、入院 100 万件あたり 9.5 例で、Kim らおよび Watanakunakorn らが報告している国外での発生頻度より、かなり低かった (それぞれ 86 例および 540 例) (Kim *et al.*, 2003; Watanakunakorn & Perni, 1994) .

この違いが、本当に本研究を行った地域で菌血症例が少ないのか、本研究の調査施設では血液培養を採取する頻度が低いためなのかは、はっきりしない. しかしその結果、10 年間調査を行ったものの、多変量解析など詳細な統計解析を行うには症例数が不十分と考えた. 本研究で調査した ESBL 産生 *P. mirabilis* 菌血症の危険因子の単変量

解析では、3つの因子（先行投与された抗菌薬を種類別にすると合計4つ）に有意差を認めたと、これらの因子を多変量解析するには、少なくとも *P. mirabilis* 菌血症を150-200症例集める必要があると考える。今後は、調査期間を延長したり調査参加施設数を増やすことによって、より多くの該当症例を集め、ESBL産生 *P. mirabilis* 菌血症の詳細な解析を進める予定である。

総括

ESBL産生 *P. mirabilis* による菌血症の特徴を調査するために、茨城県南地区の基幹病院で起こった64例の *P. mirabilis* 菌血症とそれらの症例で分離した株を調査した。その結果、分離したESBL産生株は、全て *bla*_{CTX-M-2} グループのESBL産生遺伝子を保有していたが、ほとんどの株でジェノタイプが異なることから、水平伝播ではなく、それぞれの株が他のESBL産生菌から独自にESBL産生遺伝子を取得したと考えた。ESBL産生株による菌血症の発症には、院内での発症、透析の既往、1ヶ月以内の抗菌薬の先行投与、の3つの因子が有意に関連していた。また、ESBL非産生株によるものと比べ、発症初期に有効な抗菌薬が投与されていない症例が有意に多かったが、30日後の死亡率はほぼ同等だった。このことは、*P. mirabilis* 菌血症では、有効な抗菌薬の投与が数日遅れても転帰に影響しない可能性を示唆しており、広域抗菌薬の投与を薬剤感受性が判明するまで控えることができるかもしれない。詳細な統計学的解析を行うため、今後もより多くの該当症例を集める予定である。

謝 辞

本研究を行うにあたり，多くの方にご指導とご協力をいただきました．

はじめに，研究の立案と論文の作成をご指導いただいた，筑波大学医学医療系教授川上康先生に深謝いたします．また，本研究の遂行に当たり，さまざまな助言を頂いた医学医療系教授人見重美先生に深く感謝申し上げます．

最後に，患者さんの臨床情報の調査および菌株の分与に快くご協力いただきました，関係施設の先生，細菌検査室技師の皆様に，厚くお礼申し上げます．

参考文献

Abbott, S. L. (2007). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; p. 698-715.

Adler, J. L., J. P. Burke, D. F. Martin & M. Finland. (1971). *Proteus* infections in a general hospital. II. Some clinical and epidemiological characteristics. With an analysis of 71 cases of *Proteus* bacteremia. *Ann Intern Med* **75**(4): 531-536.

Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**(1036): 321-331.

American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* **20**(6):864-874.

Anderson, D. J., J. J. Engemann, L. J. Harrell, Y. Carmeli, L. B. Reller & K. S. Kaye. (2006). Predictors of mortality in patients with bloodstream infection due to ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(5): 1715-1720.

Bauernfeind, A., H. Grimm & S. Schweighart. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* **18**(5): 294-298.

Ben-Ami, R., J. Rodriguez-Bano, H. Arslan, J. D. Pitout, C. Quentin, E. S. Calbo, O. K. Azap, C. Arpin, A. Pascual, D. M. Livermore, J. Garau & Y. Carmeli. (2009). A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum

beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis* **49**(5): 682-690.

Berger, S. A. (1985). *Proteus* bacteraemia in a general hospital 1972-1982. *J Hosp Infect.* 1985;**6**(3): 293-298.

Bishara, J., L. Leibovici, D. Huminer, M. Drucker, Z. Samra, H. Konisberger & S. Pitlik. (1997). Five-year prospective study of bacteraemic urinary tract infection in a single institution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**(8): 563-567.

Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(1): 1-14.

Brasme, L., P. Nordmann, F. Fidel, M. F. Lartigue, O. Bajolet, L. Poirel, D. Forte, V. Vernet-Garnier, J. Madoux, J. C. Reveil, C. Alba-Sauviat, I. Baudinat, P. Bineau, C. Bouquigny-Saison, C. Eloy, C. Lafaurie, D. Simeon, J. P. Verquin, F. Noel, C. Strady & C. De Champs. (2007). Incidence of class A extended-spectrum beta-lactamases in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* **60**(5): 956-964.

Canton, R., A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero & T. M. Coque. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl. 1**: 144-153.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Coker, C., C. A. Poore, X. Li & H. L. Mobley. (2000). Pathogenesis of *Proteus*

mirabilis urinary tract infection. *Microbes Infect* **2**(12): 1497-1505.

Datta, N. & P. Kontomichalou. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* **208**(5007): 239-241..

De Rosa, F. G., N. Pagani, L. Fossati, S. Raviolo, C. Cometto, P. Cavallerio, C. Parlato, E. Guglielmi, R. Serra & G. Di Perri. (2011). The effect of inappropriate therapy on bacteremia by ESBL-producing bacteria. *Infection* **39**(6): 555-561.

Donnenberg, M. S. (2005). *Enterobacteriaceae*. In: G. L. Mandel, J. E. Bennett & R. Dolin, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th Edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; p. 2567-2586.

Endimiani, A., F. Luzzaro, G. Brigante, M. Perilli, G. Lombardi, G. Amicosante, G. M. Rossolini & A. Toniolo. (2005). *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(7): 2598-2605.

Farmer, J. J. III, K. D. Boatwright & J. M. Janda. (2007). *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; p. 649-669.

Ishii, Y., A. Ohno, H. Taguchi, S. Imajo, M. Ishiguro & H. Matsuzawa. (1995). Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(10): 2269-2275.

Ishikawa, K., T. Matsumoto, M. Yasuda, S. Uehara, T. Muratani, M. Yagisawa, J.

Sato, Y. Niki, K. Totsuka, K. Sunakawa, H. Hanaki, R. Hattori, M. Terada, T. Kozuki, A. Maruo, K. Morita, K. Ogasawara, Y. Takahashi, K. Matsuda, T. Hirose, N. Miyao, T. Hayashi, K. Takeyama, H. Kiyota, M. Tomita, H. Yusu, H. Koide, S. Kimura, M. Yanaoka, H. Sato, T. Ito, T. Deguchi, Y. Fujimoto, H. Komeda, Y. Asano, Y. Takahashi, S. Ishihara, S. Arakawa, Y. Nakano, K. Tanaka, M. Fujisawa, T. Matsui, A. Fujii, S. Yamamoto, M. Nojima, Y. Higuchi, Y. Ueda, S. Kanamaru, K. Monden, T. Tsushima, Y. Seno, M. Tsugawa, T. Takenaka, R. Hamasuna, N. Fujimoto, T. Sho, K. Takahashi, H. Inatomi, N. Takahashi, Y. Ikei, H. Hayami, T. Yamane, M. Nakagawa, S. Kariya & T. Arima. (2011). The nationwide study of bacterial pathogens associated with urinary tract infections conducted by the Japanese Society of Chemotherapy. *J Infect Chemother* **17**(1): 126-138.

Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek & D. C. Hooper. (2006). *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(4): 1178-1182.

Kahlmeter, G. (2008). Breakpoints for intravenously used cephalosporins in *Enterobacteriaceae*-EUCAST and CLSI breakpoints. *Clin Microbiol Infect* **14** Suppl. 1: 169-174.

Kanayama, A., T. Iyoda, K. Matsuzaki, T. Saika, F. Ikeda, Y. Ishii, K. Yamaguchi & I. Kobayashi. (2010). Rapidly spreading CTX-M-type beta-lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. *Int J Antimicrob Agents* **36**(4): 340-342.

Karas, J. A., D. G. Pillay, D. Muckart & A. W. Sturm. (1996). Treatment failure due to extended spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* **37**(1): 203-204.

Kim, B. N., N. J. Kim, M. N. Kim, Y. S. Kim, J. H. Woo & J. Ryu. (2003). Bacteraemia due to tribe *Proteeae*: a review of 132 cases during a decade

(1991-2000). *Scand J Infect Dis* **35**(2): 98-103.

Kim, J. Y., E. Lautenbach, J. Chu, M. Goyal, I. Nachamkin, K. McGowan, S. Coffin & T. Zaoutis. (2008). Fluoroquinolone resistance in pediatric bloodstream infections because of *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. *Am J Infect Control* **36**(1): 70-73.

Kim, Y. K., H. Pai, H. J. Lee, S. E. Park, E. H. Choi, J. Kim, J. H. Kim & E. C. Kim. (2002). Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(5): 1481-1491.

Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal & S. Mitsuhashi. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **11**(6): 315-317.

Lautenbach, E., B. L. Strom, W. B. Bilker, J. B. Patel, P. H. Edelstein & N. O. Fishman. (2001). Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis* **33**(8): 1288-1294.

Lucet, J. C., S. Chevret, D. Decre, D. Vanjak, A. Macrez, J. P. Bedos, M. Wolff & B. Regnier. (1996). Outbreak of multiply resistant *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clin Infect Dis* **22**(3): 430-436.

Mathai, D., P. R. Rhomberg, D. J. Biedenbach, R. N. Jones & G. India Antimicrobial Resistance Study. (2002). Evaluation of the in vitro activity of six broad-spectrum beta-lactam antimicrobial agents tested against recent clinical isolates from India: a survey of ten medical center laboratories. *Diagn Microbiol*

Infect Dis 44(4): 367-377.

Medeiros, A. A. (1984). Beta-lactamases. *Br Med Bull* 40(1): 18-27.

Mobley, H. L. & R. Belas. (1995). Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. *Trends Microbiol* 3(7): 280-284.

Nagano, N., N. Shibata, Y. Saitou, Y. Nagano & Y. Arakawa. (2003). Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 41(12): 5530-5536.

O'Hara, C. M., F. W. Brenner & J. M. Miller. (2000). Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev* 13(4): 534-546.

Pangon, B., C. Bizet, A. Bure, F. Pichon, A. Philippon, B. Regnier & L. Gutmann. (1989). In vivo selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 beta-lactamase. *J Infect Dis* 159(5): 1005-1006.

Paterson, D. L. & R. A. Bonomo. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18(4): 657-686.

Paterson, D. L., W. C. Ko, A. Von Gottberg, J. M. Casellas, L. Mulazimoglu, K. P. Klugman, R. A. Bonomo, L. B. Rice, J. G. McCormack & V. L. Yu. (2001). Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 39(6): 2206-2212.

Pitout, J. D., N. D. Hanson, D. L. Church & K. B. Laupland. (2004).

Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum beta-lactamases: importance of community isolates with *bla*_{CTX-M} genes. *Clin Infect Dis* **38**(12): 1736-1741.

Pitout, J. D. & K. B. Laupland. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* **8**(3): 159-166.

Rodriguez-Bano, J., M. D. Navarro, L. Romero, M. A. Muniain, E. J. Perea, R. Perez-Cano, J. R. Hernandez & A. Pascual. (2006). Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* **42**(1): 37-45.

Shibata, N., H. Kurokawa, Y. Doi, T. Yagi, K. Yamane, J. Wachino, S. Suzuki, K. Kimura, S. Ishikawa, H. Kato, Y. Ozawa, K. Shibayama, K. Kai, T. Konda & Y. Arakawa. (2006). PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(2): 791-795.

Sirot, D., C. De Champs, C. Chanal, R. Labia, A. Darfeuille-Michaud, R. Perroux & J. Sirot. (1991). Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended-spectrum beta-lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**(8): 1576-1581.

Sohn, K. M., C. I. Kang, E. J. Joo, Y. E. Ha, D. R. Chung, K. R. Peck, N. Y. Lee & J. H. Song. (2011). Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Proteus mirabilis* bacteremia. *Korean J Intern Med* **26**(1): 89-93.

Sturenburg, E. & D. Mack. (2003). Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect* **47**(4): 273-295.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing & B. Swaminathan. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**(9): 2233-2239.

Thomson, K. S. & E. S. Moland. (2001). Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**(12): 3548-3554.

Tumbarello, M., M. Sanguinetti, E. Montuori, E. M. Treccarichi, B. Posteraro, B. Fiori, R. Citton, T. D'Inzeo, G. Fadda, R. Cauda & T. Spanu. (2007). Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(6): 1987-1994.

Wang, P., F. Hu, Z. Xiong, X. Ye, D. Zhu, Y. F. Wang & M. Wang. (2011). Susceptibility of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* according to the new CLSI breakpoints. *J Clin Microbiol* **49**(9): 3127-3131.

Watanakunakorn, C. & S. C. Perni. (1994). *Proteus mirabilis* bacteremia: a review of 176 cases during 1980-1992. *Scand J Infect Dis* **26**(4): 361-367.

Yoshida, I., T. Yamaguchi, Y. Itoh, M. Tachibana, C. Takahashi, M. Kaku, K.

Kanemitsu, M. Okada, Y. Horikawa, J. Shiotani, H. Kino, Y. Ono, H. Baba, S. Matsuo, S. Asari, M. Toyokawa, K. Matsuoka, N. Kusano, M. Nose, M. Murase, H. Miyamoto, T. Saikawa, K. Hiramatsu, S. Kohno, K. Yanagihara, N. Yamane, I. Nakasone, H. Maki & Y. Yamano. (2010). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of aerobic Gram-negative bacteria in 2006. *Jpn J Antibiot* **63**(6): 457-479.

表 1. ESBL 遺伝子の増幅に用いた PCR プライマーの塩基配列と反応条件.

標的 遺伝子	プライマーの塩基配列	PCR 条件			文献
		denature	annealing	extension	
<i>bla</i> _{TEM}	5'-GGG GAG CTC ATAAAA TTC TTG AAG AC-3' 5'-GGG GGA TCC TTA CCA ATG CTT AAT CA-3'	95°C, 30 秒	42°C, 60 秒	72°C, 60 秒	Perilliet <i>et al.</i> , 2002
<i>bla</i> _{SHV}	5'-GCC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC-3' 5'-TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA-3'	95°C, 30 秒	58°C, 60 秒	72°C, 60 秒	Perilliet <i>et al.</i> , 2002
<i>bla</i> _{CTX-M}	5'-TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA-3' 5'-CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A-3'	95°C, 20 秒	51°C, 30 秒	72°C, 30 秒	Edelstein <i>et al.</i> , 2003
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	5'-AAG GAA TCC CAT GGT TAA-3' 5'-CCG TTT CCG CTA TTA CAA-3'	94°C, 90 秒	48°C, 60 秒	72°C, 120 秒	Brasme <i>et al.</i> , 2007
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	5'-ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG-3' 5'-TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC-3'	94°C, 60 秒	60°C, 60 秒	72°C, 90 秒	Saladin <i>et al.</i> , 2002
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	5'-CGG ATG ATG CTA ATG ACAAC-3' 5'-GTC AGA TTG CGAAGC GTC-3'	94°C, 60 秒	55°C, 60 秒	72°C, 90 秒	Shibata <i>et al.</i> , 2006
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	5'-ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA-3' 5'-CCC TTC GGC GAT GAT TCT C-3'	94°C, 60 秒	62°C, 60 秒	72°C, 60 秒	Saladin <i>et al.</i> , 2002

表 2. ESBL 産生および非産生 *P. mirabilis* 菌血症の臨床的特徴.

変数	合計 (n=64)	分離株の ESBL 産生能		p 値
		ESBL 産生株 (n=13)	ESBL 非産生株 (n=51)	
年齢中央値 (範囲)	78 (37-93)	69 (37-83)	78 (19-93)	0.22
≥ 65 歳 (%)	51 (80)	10 (77)	41 (80)	0.72
男性 (%)	33 (51)	9 (69)	24 (47)	0.22
菌血症の初発感染巣 (%)				
尿路				-
カテーテル留置あり	18 (28)	4 (31)	14 (27)	
カテーテル留置なし	18 (28)	2 (15)	16 (31)	
中心静脈カテーテル	5 (7.8)	1 (7.7)	4 (7.8)	
肺炎	2 (3.1)	1 (7.7)	1 (2.0)	
褥創	7 (11)	2 (15)	5 (9.8)	
胆道	1 (1.6)	0 (0.0)	1 (2.0)	
腹腔内膿瘍	3 (4.7)	1 (7.7)	2 (3.9)	
不明	10 (16)	2 (15)	8 (16)	
発症場所 (%)				
病院内	31 (48)	10 (77)	21 (41)	0.030*
老人施設	7 (11)	1 (7.7)	6 (12)	1.0
基礎疾患 (%)				
心疾患	12 (19)	4 (31)	8 (16)	0.24
肺疾患	2 (3.1)	0 (0.0)	2 (3.9)	1.0
肝胆道系疾患	1 (1.6)	1 (7.7)	0 (0.0)	0.20
透析	5 (7.8)	4 (31)	1 (2.0)	0.0050*
固形癌	17 (27)	4 (31)	13 (25)	0.73
糖尿病	17 (27)	5 (38)	12 (24)	0.30
神経疾患	31 (48)	6 (46)	25 (49)	0.85
血液疾患	2 (3.1)	1 (7.7)	1 (2.0)	0.37

(続く)

表 2. (続き)

12ヶ月以内の手術 (%)	15 (23)	5 (38)	10 (20)	0.16
1ヶ月以内の抗菌薬使用 (%)	18 (28)	7 (54)	11 (22)	0.036*
PEN/CEP†	7 (11)	4 (31)	3 (5.9)	0.010*
PEN/CEP + BLI †	5 (7.8)	2 (15)	3 (5.9)	0.27
カルバペネム	3 (4.7)	0 (0.0)	3 (5.9)	1.0
CEM/OXC †	3 (4.7)	1 (7.7)	2 (3.9)	0.50
フルオロキノロン	3 (4.7)	3 (23)	0 (0.0)	0.0069*
1ヶ月以内の免疫抑制療法 (%)	9 (14)	3 (23)	6 (12)	0.37
72時間以内の人工物挿入 (%)				
血管カテーテル	22 (34)	7 (54)	15 (29)	0.11
尿管カテーテル	28 (44)	8 (62)	20 (39)	0.21
胆道ドレナージカテーテル	1 (1.6)	1 (7.7)	0 (0.0)	0.20
腹腔内ドレナージカテーテル	3 (4.7)	2 (15)	1 (2.0)	0.10
人工呼吸器装着	4 (6.3)	2 (15)	2 (3.9)	0.18
敗血症の重症度 (%)				
敗血症	26 (41)	6 (46)	20 (39)	0.77
重症敗血症	11 (17)	1 (7.7)	10 (20)	
敗血症性ショック	27 (42)	6 (46)	21 (41)	
複数菌性菌血症 (%)	23 (36)	5 (38)	18 (35)	0.91
適切な抗菌薬治療 (%)				
1日目	54 (83)	7 (54)	45 (88)	0.011*
4日目‡	50 (89)	8 (67)	41 (93)	0.032*
転帰 (%)				
再発	3 (4.7)	1 (7.7)	2 (3.9)	1.0
死亡	20 (31)	4 (31)	16 (31)	1.0

* 統計学的な有意差あり.

† PEN/CEP: ペニシリンおよび/あるいはセファロスポリン ; BLI: βラクタマーゼ阻害剤 ;

CEM/OXC: セファマイシンあるいはオキサセフェム.

‡ 既に死亡していた 8 例 (ESBL 産生株および非産生株でそれぞれ 1 例および 7 例) は除外した.

表 3. ESBL 産生 *P. mirabilis* 株が検出された 13 症例の特徴.

症例	性別/ 年齢	初発感染巣*	発症場所	基礎疾患†	12 ヶ月以内 の手術	1 ヶ月以内の先行抗菌薬投与‡	1 ヶ月以内の 免疫抑制療法
1	M/65	ND	病院	HD, DM, ND	なし	Other	なし
2	M/62	ND	病院	CD, HD, DM, ND	なし	なし	なし
3	M/83	PN	病院	DM, ND	なし	PEN/CEP, FQ, AG, Other	なし
4	M/69	IV	病院	CD, HB, HD, ST	あり	なし	なし
5	M/69	UT	市中	ST	あり	PEN/CEP, CEM/OXC, AG, Other	なし
6	F/76	UT	病院	なし	あり	PEN/CEP+BLI, FQ, Other	あり
7	M/82	UT	病院	なし	なし	なし	なし
8	F/82	DU	老人施設	ND	あり	PEN/CEP, FQ	なし
9	F/80	UT	病院	ML	あり	なし	あり
10	M/68	UT	市中	なし	なし	なし	あり
11	M/78	UT	病院	CD, ST, DM, ND	なし	PEN/CEP	なし
12	F/37	IA	病院	ST	なし	なし	なし
13	M/44	DU	病院	CD, HD, DM, ND	なし	PEN/CEP+BLI, Other	なし

(続く)

表 3. (続き)

症例	デバイス挿入 [§]	敗血症の重症度	同時検出菌	適切な抗菌薬療法		転帰	
				1 日目	4 日目	再発	死亡
1	なし	敗血症	なし	あり	あり	なし	あり
2	IV, UT, MV	敗血症性ショック	なし	あり	あり	なし	なし
3	IV, UT	敗血症	なし	なし	なし	なし	なし
4	IV, BD, ID	敗血症性ショック	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	なし	(死亡)	なし	あり
5	UT	敗血症	なし	あり	あり	なし	なし
6	IV, UT, MV	敗血症性ショック	なし	なし	なし	なし	なし
7	IV, UT	敗血症性ショック	<i>Staphylococcus aureus, Providencia rettgeri</i>	あり	あり	なし	なし
8	なし	重症敗血症	嫌気性グラム陽性桿菌	なし	あり	なし	なし
9	なし	敗血症性ショック	なし	なし	なし	なし	あり
10	なし	敗血症性ショック	なし	あり	あり	なし	なし
11	UT	敗血症	なし	あり	あり	なし	なし
12	IV, UT, ID	敗血症	<i>Enterococcus avium, Escherichia coli</i>	なし	なし	なし	あり
13	IV, UT	敗血症	<i>Enterococcus faecalis</i>	あり	あり	あり	なし

* DU : 褥創, IA : 腹腔内膿瘍, IV : 血管カテーテル, ND : 不明, PN : 肺炎, UT : 尿路.

† CD : 心疾患, DM : 糖尿病, HB : 肝胆道系疾患, HD : 透析, ML : 悪性リンパ腫, ND : 神経疾患, ST : 固形癌.

‡ AG : アミノグリコシド, CEM/OXC : セファマイシンあるいはオキサセフェム, FQ : フルオロキノロン, PEN/CEP : ペニシリンおよび/あるいはセファロsporin, BLI : β ラクタマーゼ阻害剤.

§ BD : 胆道ドレナージカテーテル, IV : 血管カテーテル, ID : 腹腔内ドレナージカテーテル, MV : 人工呼吸器, UT : 尿管カテーテル.

表 4. ESBL 産生株と非産生株の薬剤感受性.

抗菌薬	感性株数 (%)	
	ESBL 産生株	ESBL 非産生株
	n=13	n=51
アンピシリン	-	49 (96)
アンピシリン/スルバクタム*	9 (69)	51 (100)
セファゾリン	-	49 (96)
セフメタゾール	13 (100)	51 (100)
セフォタキシム	-	51 (100)
メロペネム	13 (100)	51 (100)
ゲンタミシン	13 (100)	50 (98)
アミカシン	13 (100)	51 (100)
ST 合剤	11 (85)	46 (90)
シプロフロキサシン*	1 (7.7)	40 (78)

* 有意差あり.

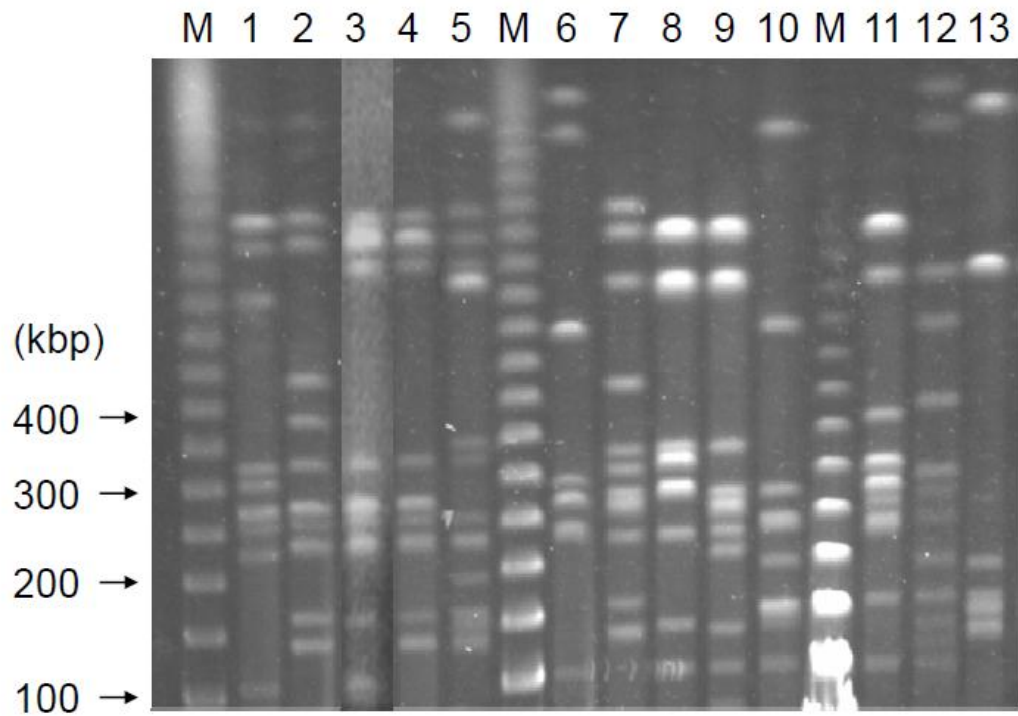


図 1. PFGE による ESBL 産生株のジェノタイプング. M : 分子量マーカー.