

## ESBL産生性腸管出血性大腸菌O26感染症分離菌株の 薬剤耐性遺伝子について

○相原 義之, 川又 祐子, 増子 京子

### 要旨

平成 27 年 8 月, 茨城県内の医療機関より ESBL 産生性腸管出血性大腸菌 O26 菌株による感染症が発生したとの報告があった。県内において ESBL 産生性腸管出血性大腸菌の検出はごく稀であったため, 収集菌株に対して詳細な薬剤耐性遺伝子検査を行った。

キーワード: 腸管出血性大腸菌 O26, ESBL, 薬剤感受性試験, DDST 法, 薬剤耐性遺伝子検査

### はじめに

ESBL (基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ) は Ambler のクラス分類でクラス A 型に属する  $\beta$  ラクタマーゼであり, 通常のペニシリナーゼでは加水分解されない第 3 世代セファロスポリン系抗生剤をも分解・不活化する。ESBL 産生菌は  $\beta$  ラクタム系抗菌薬に留まらず, ホスホマイシン<sup>1)</sup>, キノロン系<sup>2)</sup> 等, 多様な薬剤に抵抗性を示す株も存在することが報告されており, その蔓延は臨床現場における薬物治療を困難にすることから問題となっている。

菌種を大腸菌に限ると, 臨床現場で検出される ESBL 産生菌の多くは血清型が O25, O86 であることが報告されており<sup>3)</sup>, ESBL 産生性腸管出血性大腸菌の報告例は比較的少ない。しかし, 平成 27 年度において茨城県内では非常に稀であった ESBL 産生性腸管出血性大腸菌 O26 による感染症が発生し, 菌株が当所に搬入されたため, 詳細な薬剤耐性遺伝子検査を行うこととした。また, 本事例を契機に, 当所で保存していた腸管出血性大腸菌株 (平成 26 年次, 47 株) についても薬剤感受性試験を行い, ヒト由来腸管出血性大腸菌における薬剤耐性状況を調査したので, 併せて報告する。

### 事例概要

平成 27 年 8 月中旬, 茨城県 F 保健所管内において腸管出血性大腸菌 O26 感染症の発生届 (以下, F 事例と表記) があり, 検出された原因菌株が当所に搬入された。その際, 検査機関から O26 菌株が ESBL 産生菌であるとの報告があった。保健所の遡り調査によると, 患者は 7 月中旬~8 月上旬まで中国に渡航しており, 帰国間際に水様性下痢を呈していたことが判明した。そのため, 潜伏期間を考慮すると感染源は中国である可能性が高いと判断された。

また, 患者家族 1 名について, 当所において感染症届出発生に伴う接触者検便を行ったところ, 無症候性保菌者であることが確認された。

### 材料および方法

#### 1. 供試菌株

平成 26 年 1 月から 12 月に茨城県内で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例より分離された保存菌株 47 株及び F 事例における患者由来菌株 2 株を用いた。なお, F 事例の菌株 2 株は分子疫学解析(PFGE, MLVA の 2 法)の結果が完全に一致しており, 同一株であることを確認している。

## 2. 解析方法

### 2-1. 薬剤感受性試験 (Kirby-Bauer 法)

薬剤感受性試験は CLSI ガイドライン (M100-24) に従い, Mueller-Hinton 培地上でセンシディスク® (ベクトン・ディッキンソン社) を用いて行った。薬剤ディスクはアンピシリン, セフポドキシム, セフォタキシム, セフトラジジム, メロペネム, カナマイシン, ゲンタマイシン, ナリジクス酸, レボフロキサシン, テトラサイクリン, ST, クロラムフェニコールの 12 剤を用いた。

### 2-2. $\beta$ ラクタマーゼ型別試験 (DDST 法)

薬剤感受性試験の結果, セフポドキシム, セフォタキシム, セフトラジジム, メロペネムのいずれかの薬剤に耐性を示した菌株について行った。

ESBL の検出は, セフトラジジム (CAZ) とセフォタキシム (CTX) の 2 種の薬剤ディスクに加え, アモキシシリン/クラブラン酸 (ACV) とアンピシリン/スルバクタム (S/A) の 2 種の阻害剤ディスクを用いた DDST (Double Disk Synergy Test) 法により行い, 薬剤ディスクと阻害剤ディスクの間で阻止円径の拡大が確認できた場合, 陽性と判断する。(クラス A  $\beta$  ラクタマーゼ試験)。

メタロ  $\beta$  ラクタマーゼの検出は, セフトラジジム (CAZ) とメロペネム (MPM) の 2 種の薬剤ディスクに加え, メルカプト酢酸ナトリウム (SMA) ディスクを阻害剤として用いた DDST 法により行い, 薬剤ディスクと阻害剤ディスクの間で阻止円径の拡大が確認できた場合, 陽性と判断する。(クラス B  $\beta$  ラクタマーゼ試験)。

AmpC  $\beta$  ラクタマーゼの検出は, メロペネム (MPM) とセフミノクス (CMN) の 2 種の薬剤ディスクに加え, 3-アミノフェニルボロン酸溶液 (APB) を阻害剤として行い, ボロン酸溶液を添加した薬剤ディスクの阻止円がボロン酸

非添加薬剤ディスクの阻止円と比べて拡大した場合, 陽性と判断する。(クラス C  $\beta$  ラクタマーゼ試験)。

### 2-3. ESBL 産生遺伝子検出 (PCR 法)

ESBL 産生菌と考えられた菌株について, 柴田らの方法<sup>4)</sup> に基づいて, PCR 検査を行った。検出対象の遺伝子は SHV 型, TEM 型, CTX-M-1 グループ, CTX-M-2 グループ, CTX-M-9 グループの 5 種とした。

## 試験結果

まず, 平成 26 年次に収集した腸管出血性大腸菌株 47 株について薬剤感受性試験を行ったところ, 表 1 に示すように, いずれかの薬剤に耐性を示した菌株は 12 株確認されたが, 全株ともセフェム系抗生剤には感性であり, ESBL 産生菌株は検出されなかった。

一方で, F 事例由来菌株は 2 株とも, アンピシリン, セフポドキシム, セフォタキシム, ナリジクス酸, テトラサイクリン, クロラムフェニコールに耐性を示し, レボフロキサシンに中間耐性を示すことが確認された。

そこで, F 事例由来株に対して  $\beta$  ラクタマーゼ型別試験を行ったところ, 図 1 に示すようにクラス A  $\beta$  ラクタマーゼ (ESBL) 試験のみ陽性となり, ESBL 産生菌であると判断された。また, その際に薬剤ディスクの阻止円径は CTX > CAZ となることが同時に観測された。

続いて, PCR 法により ESBL 産生遺伝子の検出を試みたところ, CTX-M-9 型遺伝子のバンドが確認され, F 事例由来 O26 菌株が CTX-M-9 グループ遺伝子を有することがわかった。そこで CTX-M-9 型遺伝子領域を PCR 法により増幅してシーケンス解析を行い, 国立遺伝学研究所データベース上でアミノ酸配列の相同性検索 (blastx) を行ったところ, CTX-M-65 型遺伝子であることが確認された。

## 考察

今回検出された CTX-M-65 型遺伝子は、CTX-M-9 グループの中で最も検出率が高いと報告されている CTX-M-14 型遺伝子と比べて 2 つのアミノ酸が変異しており (p.A80V, p.S275R), 現在, 中国において検出率が増加している薬剤耐性遺伝子の 1 つである<sup>5)</sup>。CTX-M 型の薬剤耐性遺伝子を保有する菌株は, 第 3, 4 世代セファロスポリン系抗生剤に耐性を示すばかりではなく, キノロン系抗菌薬, アミノグリコシド系抗菌薬, ホスホマイシン等の薬剤に対する耐性遺伝子も同時に保有していることがある<sup>6)</sup>。実際に F 事例由来菌株においても, 第 3, 4 世代セファロスポリン系, ホスホマイシンに耐性を示し, レボフロキサシンに中間耐性を示すことが確認された。幸い, アミノグリコシド系薬剤に対しては感性を示したため, 患者の治療に用いることが出来たと考えられるが, 使用する抗菌薬の選択肢が大きく制限されることとなった。

このように, 薬剤耐性菌の出現は臨床現場に大きなインパクトを与えるが, CTX-M 型の薬剤耐性遺伝子はプラスミド上に存在しており, 他菌種へ水平伝播してしまうため, 地域的・世界的に拡散してしまう危険性をはらんでいる。厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) 検査部門の 2014 年報 (CLSI2012 試行版) によると, セフォタキシム耐性大腸菌の検出率は 23.3% となっており, 2000 年以降, 増加傾向にある。これは近年, 日本において CTX-M 型 ESBL の検出率が増加していることと相関しており, 薬剤耐性遺伝子の爆発的な広がりを示唆している。

ESBL 産生菌は健常人や食肉からも検出されていることが報告されており, 市中蔓延が懸念されている。そのため, 検出される薬剤耐性遺伝子型を把握し, その動向を調査することは公

衆衛生上, 重要なことと考えられる。薬剤耐性遺伝子の種類と特徴は時代とともに変化するので, 常に最新の情報を収集し, 対象遺伝子に応じて検査環境もアップデートしていくことが大切である。

## 謝辞

薬剤感受性試験,  $\beta$ ラクタマーゼ型別検査及び薬剤耐性遺伝子検出法について, 懇切丁寧な指導と助言を下さいました国立感染症研究所細菌第二部 鈴木里和先生, 松井真理先生に深謝いたします。

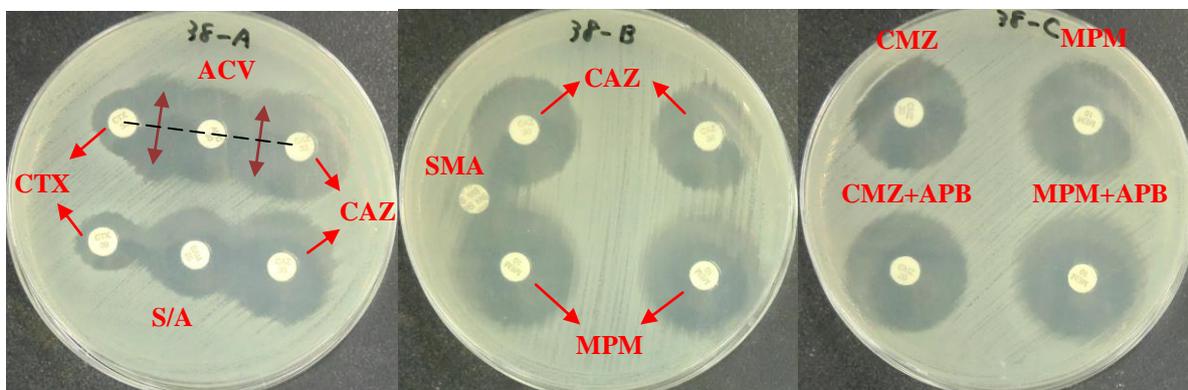
## 文献

- 1) Wachino, J. *et al*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **54** (2010), 3061-3064.
- 2) Johnson, J. R. *et al*, *Clin. Infect. Dis.* **51** (2010), 286-294.
- 3) Suzuki, S. *et al*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **63** (2009), 72-79.
- 4) Shibata, N. *et al*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **50** (2006), 791-795.
- 5) Xu, G. *et al*, *Front. Microbiol.* **6** (2015), 1103.
- 6) Pitout, J. D. D. *et al*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **51** (2007), 1281-1286.

表 1 : 薬剤感受性試験結果一覧

	抗菌薬 (×: 耐性, △: 中間耐性)								菌株数
	ABPC	TC	CP	ST	NA	LVFX	CPDX	CTX	
平成26年次 収集株	×								4株
		×							1株
			×						1株
	×			×					2株
	×	×	×						3株
		×	×			×			1株
F事例株	×	×	×	×	×	△	×	×	2株

ABPC:アンピシリン, TC:テトラサイクリン, CP:クロラムフェニコール, ST:ST合剤,  
NA:ナリジクス酸, LVFX:レボフロキサシム, CPDX:セフトロキム, CTX:セフトキシム



(図 1) 左 : クラス A βラクタマーゼ試験 (ディスク間で阻止円径拡大が確認されたため, 陽性)  
 中央 : クラス B βラクタマーゼ試験 (阻止円径に変化が見られず, 陰性)  
 右 : クラス C βラクタマーゼ試験 (阻止円径に変化が見られず, 陰性)

表 2 : 薬剤耐性遺伝子検出用プライマーと PCR 反応条件

遺伝子型	プライマー配列(5' → 3')	シーケンス解析	プライマー配列(5' → 3')
TEM	F: CCG TGT CGC CCT TAT TCC R: AGG CAC CTA TCT CAG CGA	CTX-M-9型 遺伝子領域	(増幅) F: ATG GTG ACA AAG AGA GTG CAA R: TCA CAG CCC TTC GGC GAT  (シーケンス解析) F1: ATG GTG ACA AAG AGA GTG CAA F2: GCA GAT AAT ACG CAG GTG R: CGG CGT GGT GGT GTC TCT
SHV	F: ATT TGT OGC TTC TTT ACT CGC R: TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC		
CTX-M-1グループ	F: GCT GTT GTT AGG AAG TGT GC R: CCA TTG CCC GAG GTG AAG		
CTX-M-2グループ	F: ACG CTA CCC CTG CTA TTT R: GCT TTC CGC CTT CTG CTC		
CTX-M-9グループ	F: GCA GAT AAT ACG CAG GTG R: CGG CGT GGT GGT GTC TCT		

薬剤耐性遺伝子検出・シーケンス増幅				シーケンス解析			
	温度	時間	サイクル数		温度	時間	サイクル数
初期変性	94°C	2min	1	初期変性	96°C	70sec	1
変性	94°C	1min	35	変性	96°C	10sec	25
アニーリング	55°C	1min		アニーリング	55°C	5sec	
伸長反応	72°C	1.5min		伸長反応	60°C	4min	
最終伸長	94°C	5min	1	最終伸長			