

# 基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼを産生する

## 腸管出血性大腸菌 O15 の遺伝子解析

### Genomic Analysis of Extended-spectrum $\beta$ -Lactamase-Producing Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O15

山口 友美 木村 葉子 矢崎 知子 後藤 郁男 畠山 敬 沖村 容子  
Yumi YAMAGUCHI, Yoko KIMURA, Tomoko YAZAKI, Ikuo GOTO, Takashi HATAKEYAMA,  
Yoko OKIMURA

平成 23 年度に検出された腸管出血性大腸菌 (EHEC) 77 株について基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌のスクリーニングを行ったところ、健康保菌者から分離された EHEC O15:H16 (Stx2 産生) 1 株が ESBL 産生菌であることが確認された。また、この株は PCR 法による志賀毒素遺伝子確認試験では *stx2* 陽性となったが、RPLA 法による志賀毒素産生性試験では陰性と判定されたため、*stx2* 遺伝子のサブタイピングを行ったところ、*stx2g* であることが確認された。

キーワード：基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL)；腸管出血性大腸菌；*stx2g*；セフトキシム

Key words: extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)；Enterohemorrhagic *E.coli*；*stx2g*；cefotaxime

#### 1 はじめに

2011 年 5 月、ドイツを中心としたヨーロッパ各国において EHEC による大規模なアウトブレイクが発生した。この原因となった EHEC O104:H4 は、ESBL 産生菌であることが確認されている。

また、海外のみならず国内においても ESBL 産生大腸菌の検出率は近年増加してきており、臨床材料から 2004-2006 年に分離された大腸菌の 4.7%、2007-2008 年では 6.3%が ESBL 産生菌であったという報告<sup>1)</sup>がある。さらに EHEC においても ESBL 産生菌が数例報告されており<sup>2-4)</sup>、その蔓延が危惧される。

そこで今回、宮城県で平成 23 年度に検出された EHEC について ESBL 産生菌のスクリーニングを行ったところ、健康保菌者から分離された EHEC O15:H16 (Stx2 産生) 1 株が ESBL 産生菌であることが確認さ

れたため、この株について遺伝子解析を行ったので報告する。

#### 2 方法

##### 2.1 ESBL 産生菌スクリーニング

マッコンキー寒天培地 (栄研化学) にセフトキシム (CTX) 4mg/L を添加した培地に EHEC 菌株を塗抹培養し、発育した菌株を薬剤感受性試験および遺伝子解析実施対象株とした。

##### 2.2 薬剤感受性試験

ドライプレート 栄研 (DPD1) を用いて、微量液体希釈法により MIC を測定した。供試薬剤は、アンピシリン (ABPC)、ピペラシリン (PIPC)、CTX、CTX/クラブラン酸 (CVA)、セフトジジム (CAZ)、CAZ/CVA、セフトキシム (CPDX)、CPDX/CVA、

表 1 ESBL 産生遺伝子検出用プライマー

ESBL 遺伝子型	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	PCR産物サイズ (bp)	文献
TEM	T1	CCGTGTCGCCCTTATTCC	824	5)
	T2	AGGCACCTATCTCAGCGA		
SHV	S1	ATTTGTCGCTTCTTACTCGC	1051	5)
	S2	TTTATGGCGTTACCTTTGACC		
CTX-M-1 group	CTX-M-1-F	GCTGTTGTTAGGAAGTGTGC	516	6)
	CTX-M-1-R	CCATTGCCCGAGGTGAAG		
CTX-M-2 group	CTX-M-2-F	ACGCTACCCCTGCTATTT	779 or 780	6)
	CTX-M-2-R	CCTTCCGCTTCTGCTC		
CTX-M-9 group	CTX-M-9-F	GCAGATAATACGCAGGTG	393	6)
	CTX-M-9-R	CGGCGTGGTGGTGTCTCT		

表 2 *stx2* 遺伝子サブタイピング用プライマー

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	PCR産物 サイズ (bp)
<i>stx2</i> , <i>stx2vha</i> , <i>stxvhb</i>	VT2-c	AAGAAGATGTTTATGGCGGT	285
	VT2-d	CACGAATCAGGTTATGCCTC	
<i>stx2</i> , <i>stx2vha</i> , <i>stx2vhb</i> , <i>stx2d-Ount</i> , <i>stx2d-OX3a</i>	VT2-e	AATACATTATGGGAAAGTAATA	348 or 349
	VT2-f	TAAACTGCACTTCAGCAAAT	
<i>stx2g</i>	209F	GTTATATTTCTGTGGATATC	573
	781R	GAATAACCGCTACAGTA	

表 3 CTX-M2 group シークエンス用プライマー

プライマー名	塩基配列 (5'-3')
CTX-M2seq1F	CTTGAAGGCCRAGGGATAAT
CTX-M2seq1R	TCCAGACGGAAGGTCTCATC
CTX-M2seq2F	CGCTGCAGTATAGCGACAAT
CTX-M2seq2R	CGTTGCAAGACAAGACTGAAG

表 4 大腸菌病原因子検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	PCR産物 サイズ (bp)	文献
<i>eae</i>	mSK1	CCGGCACAAGCATAAGC	310	10)
	eaekas_a	TGGCAAAATGATCTGCTG		
<i>bfpA</i>	EP1	AATGGTGCTTGGCGTTGCTGC	326	11)
	EP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
<i>aggR</i>	AggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254	12)
	AggRks2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC		
<i>astA</i>	EAST-1S	GCCATCAACACAGTATATCC	106	13)
	EAST-1AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC		
<i>hlyA</i>	hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTCC	534	14)
	hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		

フロモキシセフ (FMOX), スルバクタム / セフォペラゾン (SBT/CPZ), アズトレオナム (AZT), ミノサイクリン (MINO), ホスホマイシン (FOM), メロペネム (MEPM), アミカシン (AMK), ゲンタマイシン (GM), レボフロキサシン (LVFX), シプロフロキサシン (CPFX), イミペネム (IPM) の 19 薬剤である。

### 2.3 ESBL 型別

TEM, SHV, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group および CTX-M-9 group の各遺伝子 5 種類に対する特異的なプライマー (表 1) を用いて, PCR 法により *-*ラクタマーゼ遺伝子を検出した。

### 2.4 *stx2* 遺伝子のサブタイピング

Tyler らの報告<sup>7)</sup> および Piérard らの報告<sup>8)</sup> に従い, PCR-RFLP 法を用いて行った。

Tyler らの方法としては, 表 2 の VT2-c, VT2-d プライマーを用いて PCR 法を行い, 得られた増幅産物 (285bp) を制限酵素 *Hae*, *Rsa* (TaKaRa) および *Nei* (ニッポンジーン) で処理した。

また, Piérard らの方法としては, 表 2 の VT2-

e, VT2-f プライマーを用いて PCR 法を行い, 得られた増幅産物 (348bp) を制限酵素 *Hae* および *Pvu* (TaKaRa) で処理した。

さらに, 209F, 781R プライマー<sup>9)</sup> を用いて *stx2g* 遺伝子の検出を行った。

### 2.5 塩基配列の決定

*-*ラクタマーゼ遺伝子については, 表 3 に示すシークエンス用プライマーを設計し, このプライマーを用いて得られた PCR 産物を, *stx2g* 遺伝子については 209F および 781R プライマーにより得られた PCR 産物を BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いてシークエンス反応を行い, Applied biosystems 3130 Genetic Analyzer にて解析し, 塩基配列を決定した。

### 2.6 志賀毒素産生試験

以下に示す 3 種類の培養法を用い, VTEC-RPLA 「生研」 (デンカ生研) にて測定を行った。結果の判定は, 凝集価が 1:4 以上の場合を陽性, 1:2 の場合は判定保留, 1:2 未満を陰性とした。

#### 2.6.1 振とう培養法

表5 薬剤感受性試験結果

薬剤	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	薬剤	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
ABPC	>32	AZT	>16
PIPC	>64	MINO	2
CTX	>32	FOM	32
CTX/CVA	0.12/4	IPM	1
CAZ	2	MEPM	4
CAZ/CVA	0.12/4	AMK	8
CPDX	>32	GM	2
CPDX/CVA	0.25	LVFX	2
FMOX	8	CPFX	1
SBT/CPZ	16/16		

被検菌株を CAYE 培地に接種して 37 で 16~20 時間振とう培養し、その培養液を遠心分離して採取した上清を測定試料とした。

#### 2.6.2 静置培養法

被検菌株を BHI 寒天培地の全面に接種し、37 で 16~20 時間静置培養した。培地に発育した菌体を十分量掻き取り、5,000U/ml のポリミキシン B 溶液に浮遊し、37 で 5~10 分毎に振とうしながら 30 分間反応後、遠心分離して採取した上清を測定試料とした。

#### 2.6.3 マイトマイシン C (MMC) 添加培地による振とう培養法

CAYE 培地に 100 $\mu\text{g/L}$  となるように MMC を添加した培地に被検菌株を接種し、振とう培養法と同様に処理したものを測定試料とした。

#### 2.7 大腸菌病原因子の検索

大腸菌の病原因子である *eae*, *bfpA*, *aggR*, *astA* および *hlyA* の保有について、表 4 に示したプライマーを用いて PCR 法により確認した。

### 3 結果

#### 3.1 ESBL 産生菌スクリーニング

表 6 Tyler らの方法による遺伝子切断パターン

制限酵素	遺伝子断片サイズ (bp)		
	<i>stx2</i>	<i>stx2vha</i>	<i>stx2vhb</i>
<i>Hae</i>	285	161, 124	161, 124
<i>Rsa</i>	216, 69	136, 80, 69	216, 69
<i>Nci</i>	285	285	159, 126

表 7 Piérard らの方法による遺伝子切断パターン

制限酵素	遺伝子断片サイズ (bp)				
	<i>stx2</i>	<i>stx2vha</i>	<i>stx2vhb</i>	<i>stx2d-Ount</i>	<i>stx2d-OX3a</i>
<i>Hae</i>	348	216, 132	216, 132	216, 132	167, 132, 49
<i>Pvu</i>	323, 25	323, 25	250, 73, 25	200, 120, 28	200, 120, 28

平成 23 年度に検出された EHEC 77 株のうち、CTX 加マッコンキー寒天培地に発育したものは、無症状の健康保菌者から分離された O15:H16 (*Stx2* 産生) 1 株のみであった。そのため、この株のみを対象として以下の試験を行った。

#### 3.2 薬剤感受性試験

薬剤感受性結果を表 5 に示した。

MIC 値の高い薬剤は ABPC, PIPC, CTX, CPDX, AZT であった。さらに、CTX および CPDX では CVA 添加により MIC が 3 管以上低下しており、クラブラン酸による活性阻害が認められたため ESBL 産生菌であることが示唆された。

#### 3.3 ESBL 型別および塩基配列の決定

TEM, SHV, CTX-M-1 group および CTX-M-9 group の各遺伝子については検出されなかったが、CTX-M-2 group 遺伝子の増幅が確認された。

そこで、さらに塩基配列データを解析した結果、1996 年に Bauernfeind ら<sup>15)</sup>により報告された CTX-M-2 型遺伝子と同一であることが確認された。

#### 3.4 *stx2* 遺伝子のサブタイピングおよび塩基配列の決定

まず、Tyler らの方法により VT2-c, VT2-d プライマーを用いて PCR 法を行い、285bp の増幅産物を確認した。この産物を制限酵素処理したところ、*Hae*, *Rsa* および *Nci* のいずれにおいても増幅産物は切断されなかった。Tyler らの遺伝子切断パターンによる分類を表 6 に示した。この方法では、3 種類いずれかの制限酵素で切断されなければ分類できないため、タイピングできなかった。

次に、Piérard らの方法により VT2-e, VT2-f プライマーを用いて PCR 法を行った。348bp の増幅産物が検出され制限酵素処理したところ、*Hae* および *Pvu* のいずれでも増幅産物は切断されなかった。Piérard らの遺伝子切断パターンによる分類を表 7 に示した。この方法でも、2 種類いずれかの制限酵素で切断されなければ分類できないため、タイピングできなかった。これらのことから、表 6 および表 7 に示したものの以外のサブタイプである可能性が示唆された。

この他の *stx2* サブタイプとしては、*stx2e*, *stx2f*, *stx2g* などがあげられる。Krüger ら<sup>16)</sup>は、*stx2g* におけるサブタイピング法について検証を行っている。そ

表 8 *stx2g* の遺伝子切断パターン

プライマー	制限酵素	<i>stx2g</i>
VT2-c, VT2-d	<i>Hae</i>	285
	<i>Rsa</i>	285
	<i>Nci</i>	285
VT2-e, VT2-f	<i>Hae</i>	349
	<i>Pvu</i>	349

の結果を表 8 に示した。*stx2g* は, *Hae* , *Rsa* , *Nci* および *Pvu* のいずれの制限酵素でも切断されおらず, 今回の EHEC O15 の結果と同様であった。このことから, 今回の株の *stx* 遺伝子は *stx2g* である可能性が高いと考えられたため, *stx2g* に特異的なプライマーである 209F および 781R を用いて PCR 法を行ったところ, 標的遺伝子 (573bp) とほぼ同じサイズのバンドが確認された。そこで, この増幅産物について塩基配列データを解析した結果, *stx2g* 遺伝子と同一であることを確認した。

### 3.5 志賀毒素産生試験

振とう培養法, 静置培養法および MMC 添加培地による振とう培養法, いずれの培養法においても志賀毒素産生は陰性であり, MMC 処理による毒素産生の影響は認められなかった。

### 3.6 大腸菌病原因子の検索

*eae*, *bfpA*, *aggR* および *hlyA* は検出されなかったが, *astA* が検出された。

## 4 考察

2011 年 5 月, ヨーロッパ各国において発生した大規模なアウトブレイクの原因となった EHEC O104:H4 は, ESBL 産生菌であり, その型は CTX-M-15 型であった。また国内でも, Ishii ら<sup>2)</sup>, 近ら<sup>3)</sup>, 今野ら<sup>4)</sup>が ESBL 産生 EHEC について報告しており, ESBL の型はそれぞれ CTX-M-13 型, CTX-M-3 型, CTX-M-14 型であった。

薬剤感受性サーベイランス研究会で行った ESBL 産生大腸菌の検出率調査<sup>1)</sup>の結果を外来/入院別にみた場合, 2004-2006 年では 1.7% / 6.1%であったのに対し, 2007-2008 年では 4.5% / 7.7%となっており, 特に外来における検出率が上昇している。院内感染のみならず市中における ESBL 産生大腸菌の拡散, さらには ESBL 産生 EHEC の拡散が懸念されることから, 今後その監視が必要であると考えられる。

宮城県においても平成 23 年度に検出された EHEC 中の 1 株 (O15:H16 *Stx2* 産生) が ESBL 産生菌であり, その *ラクタマーゼ* 遺伝子の塩基配列は CTX-M-2 型と同一であることが確認された。

興味深いことに, 本株の保有する *stx2* 遺伝子のサブタイプは *stx2g* であり, この株が産生する毒素は静置培養法や MMC を添加した培地による培養法を用いても RPLA 法では検出できなかった。一方, VT2 遺伝子検出用 Primer Set EVS-1&2 (TaKaRa) をはじめ, 様々な *stx2* 遺伝子検出用プライマーを用いた PCR 法での検出は可能であったことから, *stx2g* を検出するには PCR 法が必須であると思われる。

*stx2g* 遺伝子を保有する ESBL 産生大腸菌の報告は少なく, 本報告は貴重なものと考えられる。

## 5 謝辞

貴重な菌株を提供いただきました (株) 日本微生物研究所に深謝いたします。

## 6 参考文献

- 1) 薬剤感受性サーベイランス研究会  
<http://www.mic-surveillance.com/>
- 2) Ishii, Y., S. Kimura, J. Alba, K. Shiroto, M. Otsuka, N. Hashizume, K. Tamura, and K. Yamaguchi : J. Clin. Microbiol., **43**, 1072 (2005)
- 3) 近 真理奈, 倉園貴至, 大島まり子, 山口正則, 森田耕司, 渡辺 登, 金森政人, 松下 秀 : 感染症学雑誌, **79**, 161 (2005)
- 4) 今野貴之, 八柳 潤, 齊藤志保子 : 秋田県健康環境センター年報, **2**, 72 (2006)
- 5) Yagi, T., H. Kurokawa, N. Shibata, K. Shibayama, and Y. Arakawa : FEMS Microbiology Letters, **184**, 53 (2000)
- 6) 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, and Y. Arakawa : Antimicrob. Agents Chemother., **50**, 791 (2006)
- 7) Tyler, S. D., W. M. Johnson, H. Lior, G. Wang, and K. R. Rozee : J. Clin. Microbiol., **29**, 1339 (1991)
- 8) Piérard, D., G. Muylldermans, L. Moriau, D. Stevens, and S. Lauwers : J. Clin. Microbiol., **36**, 3317 (1998)
- 9) Leung, P. H. M., J. S. M. Peiris, W. W. S. Ng, R. M. Robins-Browne, K. A. Bettelheim, and W. C. Yam : Appl. Environ. Microbiol., **69**, 7549 (2003)
- 10) Narimatsu, H., K. Ogata, Y. Makino, and K. Ito : J. Clin. Microbiol., **48**, 4107 (2010)
- 11) Gunzberg, S. T., N. G. Tornieporth, and L. W. Riley : J. Clin. Microbiol., **33**, 1375 (1995)
- 12) Ratchtrachenchai, O. A., S. Subpasu, and K. Ito : Bull. Dept. Med. Sci., **39**, 211 (1997)
- 13) Yatsuyanagi, J., S. Saito, H. Sato, Y. Miyajima, K. Amano, and K. Enomoto : J. Clin. Microbiol., **40**, 294 (2002)
- 14) Paton, A. W., and J. C. Paton : J. Clin. Microbiol., **36**, 598 (1998)
- 15) Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, S. Ernst, and J. M. Casellas : Antimicrob. Agents Chemother., **40**, 509 (1996)
- 16) Krüger, A., P. M. A. Lucchesi, and A. E. Parma : J. Med. Microbiol., **56**, 1474 (2007)