

市中における薬剤耐性腸内細菌科細菌の保菌状況調査

Prevalence of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae in Community

山口 友美 木村 葉子 渡邊 節 有田 富和 後藤 郁男 畠山 敬
Yumi YAMAGUCHI, Yoko KIMURA, Setsu WATANABE, Tomikazu ARITA,
Ikuo GOTO, Takashi HATAKEYAMA

市中における薬剤耐性菌の保菌状況を把握することを目的として、平成29年4月から平成30年12月までに884人の検便検体について薬剤耐性菌スクリーニングを実施した。セファロスポリン系薬剤に耐性を示す腸内細菌科細菌が120検体(13.6%)から129株分離され、カルバペネマーゼ、基質特異性β-ラクタマーゼ(extended-spectrum β-lactamase; ESBL)およびAmpC β-ラクタマーゼ遺伝子を対象にPCR法を実施したところ、薬剤耐性遺伝子は119株から検出された。内訳は、ESBLが96株、AmpCが24株であり、カルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。さらにESBL遺伝子についてシーケンス解析による型別を行ったところ、CTX-M-27(46株:47.9%)が最も多く検出された。そのうち*E.coli* O25/Og25が40株(87.0%)を占めていること、O25/Og25のレボフロキサシン耐性率が97.7%(43/44株)と高率であったことから、今後のCTX-M-27産生*E.coli* O25/Og25の動向に注意が必要であると考えられた。

キーワード：基質特異性β-ラクタマーゼ；AmpC β-ラクタマーゼ；CTX-M-27；レボフロキサシン；O抗原
Key words：extended-spectrum β-lactamase；AmpC β-lactamase；CTX-M-27；Levofloxacin；O-antigen

1 はじめに

これまで薬剤耐性菌は、主に院内感染において問題視されてきたが、これらの細菌は一般に病原性が弱く、健康者にとってはほぼ無害な菌とされていた。しかし近年、世界各地に急激に広がりつつあるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)や院内感染対策サーベイランス(JANIS)において分離率が増加している第3世代セファロスポリン耐性*Klebsiella pneumoniae*や*Escherichia coli*は、主に病原性細菌であり胃腸炎や肺炎、膀胱炎などの直接の原因となりうる。さらに、CREなどが保有する薬剤耐性遺伝子はプラスミド上に存在し、腸内細菌科内で容易に伝達可能であるため、今後我々の身近な環境においても急速な広がりが危惧されている。

そこで、本研究では調査への同意者を対象として、薬剤耐性腸内細菌科細菌の保菌実態を調査したので報告する。

2 対象および検査方法

2.1 対象

平成29年4月から平成30年12月の期間に、腸管出血性大腸菌等感染者の関連調査に際して保健所担当者から研究の説明を受け、同意の得られた調査対象者884人の検便を検査材料とした。

2.2 分離培養

マッコンキー寒天培地にセフトキシム(CTX)を4mg/Lとなるように添加した培地およびセフトジジム(CAZ)を4mg/Lとなるように添加した培地を調製し、2分割シャーレを用いて選択分離培地を作製した。この

培地に検便検体を塗抹して37℃一晩培養後、発育したコロニーを薬剤感受性検査対象用菌株とした。

2.3 菌種の同定

TSI, LIM培地および簡易同定キットを用いて菌種を同定した。*E.coli*と同定された菌株については、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いてO血清型別を行った(血清学的手法)。O血清型別によりO型別不能となった株については、Gilmourら¹⁾のプライマーを用いた*gnd*遺伝子シーケンス解析によりO-genotypeを推定し、Iguchiら²⁾が開発したプライマーを用いたPCR法により決定した(遺伝学的手法)。

2.4 ディスク法によるβ-ラクタマーゼ産生性の確認

国立感染症研究所が公開している病原体検出マニュアル「CRE検査法」に準じて、各阻害剤(メルカプト酢酸ナトリウム、ポロン酸、クロキサシリン、クラブラン酸)を用いたスクリーニング検査を実施した。

2.5 薬剤感受性試験

ドライプレートDP31(栄研化学)を用いて、微量液体希釈法により最小発育阻止濃度を求めた。

2.6 耐性遺伝子の検出

カルバペネマーゼ遺伝子(IMP型, NDM型, KPC型, OXA-48型, VIM型, GES型), 基質特異性β-ラクタマーゼ(extended-spectrum β-lactamase; ESBL)遺伝子(CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 group)およびAmpC β-ラクタマーゼ遺伝子(MOX型, CIT型, DHA型, ACC型, EBC型, FOX型)について、PCR法により実施した。

2.7 ESBL 遺伝子の型別

ESBL 遺伝子が検出された菌株については、ESBL 遺伝子全長を決定するためのプライマー（表 1）を group ごとに設計し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

3 結果

3.1 薬剤耐性菌の分離率および菌種

本研究では、微量液体希釈法による薬剤感受性試験において、CTXまたはCAZが耐性と判定された腸内細菌科細菌を薬剤耐性菌とした。

薬剤耐性菌は検便検体120件（13.6%）から129株が分離された。1種類の耐性菌が検出された検体が112件、2種類以上の耐性菌が検出された検体は8件であった。

菌種の内訳は、*E.coli* (105株)、*Citrobacter freundii* (13株)、*Enterobacter cloacae* (5株)、*K.pneumoniae* (2株)、*Morganella morganii* (2株)、*Hafnia alvei*

(1株)、*Citrobacter sp.* (1株) であった。

3.2 菌種別の薬剤耐性タイプ

今回検出された薬剤耐性菌129株をβ-ラクタマーゼの種類で分類したところ、AmpC産生菌が34株、ESBL産生菌が96株であり、CREは検出されなかった（表2）。

AmpC産生菌は*K.pneumoniae* 以外の全ての菌種で確認された。*E.coli* はCIT型（7株）とDHA型（5株）、*C.frendii* および*Citrobacter sp.*はCIT型（9株）のみ、*M.morganii* はDHA型（2株）のみ、*H.alvei* はACC型（1株）であった。*C.frendii* 5株および*E.cloacae* 5株ではAmpC遺伝子が検出されなかったが、この10株はβ-ラクタマーゼ産生試験ではいずれもAmpC産生型と判定された。

ESBL産生菌は*E.coli* および*K.pneumoniae* のみで検出された。遺伝子型の内訳は、*E.coli* ではCTX-M-1 group（7株）、CTX-M-2 group（1株）、CTX-M-9 group（86株）、*K.pneumoniae*ではCTX-M-1 group（1株）、CTX-M-2 group（1株）であった。

また、*E.coli* 1株でAmpC（DHA型）とESBL（CTX-M-9 group）の2種類の遺伝子が検出された。

3.3 薬剤耐性*E. coli* のO抗原

AmpC産生 *E.coli* 12株およびESBL産生 *E.coli* 94株のO抗原を血清学的手法または遺伝子学的手法により決定した（表3）。

AmpC産生菌では、O20が3株、O1とOg170が2株、O18、O25、O153、OgGP7、O型別不能（O-UT）がそ

表 1 シークエンス解析用プライマー

プライマー名	塩基配列 (5'→3')
CTX-M1-seq_F	TTGTTGTTAWTTCGTMTCTTCCAGA
CTX-M1-seq_R	TATGGCCTGGTATGCGCAAG
CTX-M2seq1F	CTTGAAGGCCRAGGGATAAT
CTX-M2seq2R	CGTTGCAAGACAAGACTGAAG
CTX-M9-seq_F	CACGGATTGACCGTATTGGGA
CTX-M9-seq_R1	GTCTGCGTTGTCGGGAAGAT

表 2 菌種別の薬剤耐性タイプ

	AmpC 産生菌	遺伝子型				ESBL 産生菌	遺伝子型		
		CIT	DHA	ACC	(-)		CTX-M1G	CTX-M2G	CTX-M9G
<i>E.coli</i>	12	7	5			94	7	1	86
<i>C.frendii</i>	13	8			5	0			
<i>E.cloacae</i>	5				5	0			
<i>K.pneumoniae</i>	0					2	1	1	
<i>M.morganii</i>	2		2			0			
<i>H.alvei</i>	1			1		0			
<i>Citrobacter sp.</i>	1	1				0			
計	34	16	7	1	10	96	8	2	86

表 3 薬剤耐性 *E. coli* の O 抗原

AmpC産生菌				ESBL産生菌					
O抗原	株数	O抗原	株数	O抗原	株数	O抗原	株数	O抗原	株数
O20	3	OgGp7	1	O25/Og25	43	OgGp10	2	Og9	1
O1	2	O-UT	1	O86a/Og86	11	OgGp15	2	Og35	1
Og170	2			OgGp7	8	O8	1	Og39	1
O18	1			O1/Og1	6	O18	1	Og156	1
O25	1			Og16	4	O125	1	OgGP9	1
O153	1			Og75	4	O167	1	O-UT	5

表4 ESBL産生菌の遺伝子型による分類

	CTX-M-1G				CTX-M-2G	CTX-M-9G			
	M-3	M-15	M-23	M-55	M-2	M-14	M-24	M-27	M-65
<i>E. coli</i>									
O1/Og1						6			
O8				1					
Og9						1			
Og16						3		1	
O18								1	
O25/Og25			1		1	1		40	
Og35									1
Og39						1			
Og75				1				3	
O86a/Og86						11			
O125						1			
Og156								1	
O167						1			
OgGP7						8			
OgGP9						1			
OgGP10	1		1						
OgGP15						2			
O-UT	2					1	1		1
<i>K. pneumoniae</i>		1			1				
	3	1	2	2	2	37	1	46	2

それぞれ1株であった。

一方、ESBL産生菌では、O25/Og25が43株と最も多く、次いでO86a/Og86が11株、OgGp7が8株、O1/Og1が6株、Og16とOg75が4株となっており、O25/Og25が45.7%とESBL産生*E. coli*の約半数を占めていた。

3.4 ESBL産生菌の遺伝子型による分類

ESBL産生菌96株について、シーケンス法によりESBL遺伝子の型別を行ったところ、CTX-M-1 groupは4種類（CTX-M-3, 15, 23, 55）、CTX-M-2 groupは1種類（CTX-M-2）、CTX-M-9 groupは4種類（CTX-M-14, 24, 27, 65）が確認された。そのうち最も多かったのがCTX-M-27で46株（47.9%）、次いでCTX-M-14が37株（38.5%）であり、この2種類で全体の86.5%を占めていた（表4）。

そこで、CTX-M-27とCTX-M-14について、*E. coli* O抗原別に比較を行った。CTX-M-27ではO25/Og25が40株（87.0%）を占め、O抗原は5種類のみ（Og16, O18, O25/Og25, Og75, Og156）と偏りがあったが、CTX-M-14では、O86a/Og86が11株（29.7%）、OgGP7が8株（21.6%）、O1/Og1が6株（16.2%）など多様であり、CTX-M-27とCTX-M-14ではO抗原の種類が異なっていることが明らかとなった。

3.5 複数の薬剤耐性菌が検出された例

1検体から2種類以上の薬剤耐性菌が検出された例が8件あった（表5）。検体A~Cまでの3件は、異なる菌種が検出された例、検体D~Hは菌種は*E. coli*のみであるが、O抗原の種類が異なる例であった。

表5 複数の薬剤耐性菌が検出された例

検体	菌種およびO抗原	耐性遺伝子	備考
A	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-15	
	<i>E. coli</i> OgGP7	CTX-M-14	
B	<i>E. coli</i> O25	CTX-M-27	
	<i>C. freundii</i>	CIT	
C	<i>E. coli</i> O25	CTX-M-2	
	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-2	
D	<i>E. coli</i> O25	CTX-M-27	
	<i>E. coli</i> Og75	CTX-M-27	
E	<i>E. coli</i> O1	CTX-M-14	乳糖非分解
	<i>E. coli</i> O1	CTX-M-14	乳糖分解
	<i>E. coli</i> O167	CTX-M-14	
F	<i>E. coli</i> O25	CTX-M-27	
	<i>E. coli</i> Og156	CTX-M-27	
G	<i>E. coli</i> Og86	CTX-M-14	
	<i>E. coli</i> Og39	CTX-M-14	
H	<i>E. coli</i> O25	CTX-M-23	
	<i>E. coli</i> OgGP10	CTX-M-23	

また、検体AおよびBはそれぞれの菌が保有する耐性遺伝子が異なっていたが、検体C~Hは同じタイプの耐性遺伝子を保有していた。

3.6 薬剤感受性試験

各薬剤に対する耐性率をAmpC産生菌とESBL産生菌にわけてグラフに示した（図1）。

セファロsporin系薬であるセファゾリン（CEZ）、

CTX, セフトロキム (CPDX) の耐性率はどちらも高く、差はみられなかったが、CAZはAmpCでは高いがESBLで低く、セフェピム (CFPM) はAmpCでは低いがESBLで高いという傾向がみられた。

セファロスポリン系薬以外では、レボフロキサシン (LVFX) で特徴的な傾向がみられた。AmpC産生菌ではLVFX耐性率が3.0%であったのに対し、ESBL産生菌では71.6%と高率で、明らかな耐性率の違いが認められた。

3.6 LVFX感受性と *E. coli* O抗原の関係

図2の左グラフに、今回検出された全129株を *E. coli* とそれ以外にわけて、LVFX感受性試験の結果を示した。LVFX耐性株は *E. coli* のみに見られ、*E. coli* 以外では確認されなかった。

図2の右グラフには *E. coli* のO抗原別にLVFX感受性

試験の結果を示した。O25/Og25やO86a/Og86では1株を除きすべて耐性、反対にOgGp7では1株のみ耐性であるなど、O抗原の種類により耐性株か感受性株かが分かる傾向がみられた。

4 考察

本研究では、調査対象者の検便検体を対象として薬剤耐性腸内細菌科細菌の検索を行い、薬剤感受性試験および耐性遺伝子の解析を行った。その結果、セファロスポリン系薬 (CTX または CAZ) に耐性を示した腸内細菌科細菌の保菌率は13.6% (120 / 884 検体)、ESBL産生菌の保菌率は10.0% (88 / 884 検体)、プラスミド性AmpC産生菌の保菌率は2.7% (24/884検体)であった。ESBL産生菌の保菌率については、2010~2011年に愛知県岡崎市で行われた中根らの調査³⁾(調査①)で、4.8%

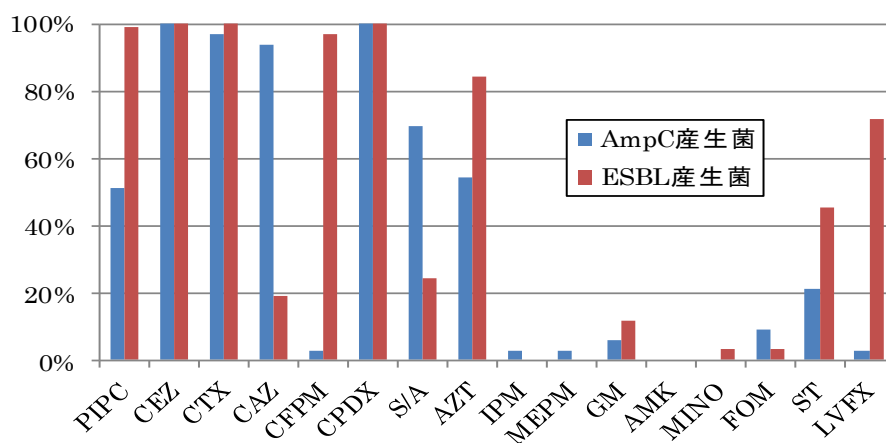


図1 各薬剤に対する耐性率

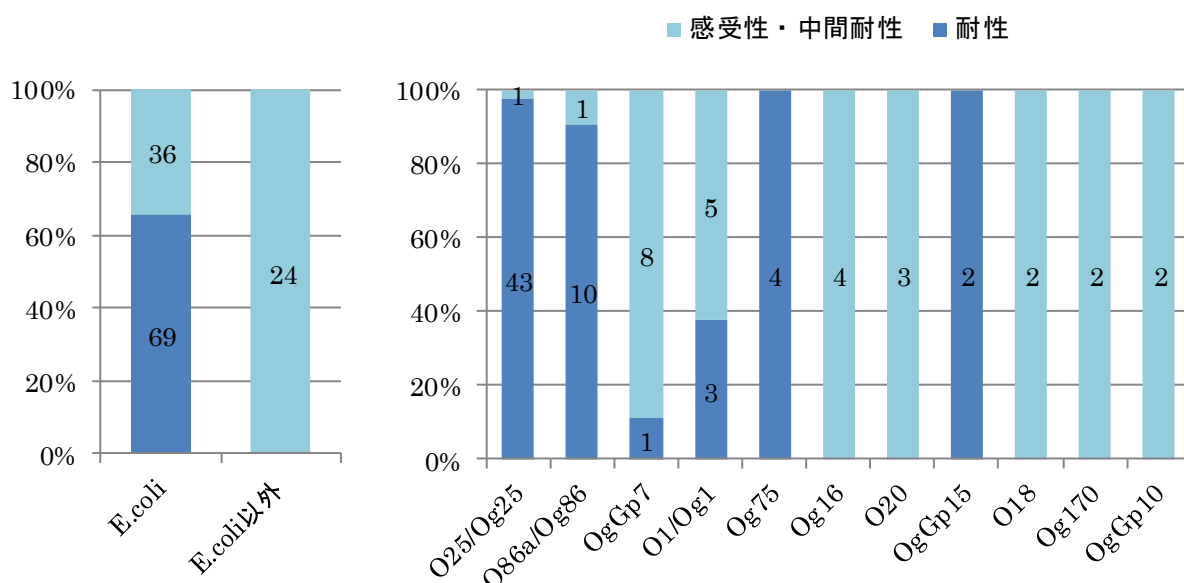


図2 レボフロキサシン感受性と *E. coli* O抗原の関係

(122/2,563 検体)であったという報告がある。この調査から7年後に行った本研究で10.0%という結果であったことは、市中における保菌率は年々増加傾向にあることを示唆していると考えられる。AmpC産生菌については他の報告がないため比較できないが、本研究が今後の調査における基礎データとして活用できると考える。CREについては、本研究では検出されなかった。2017年からCRE感染症届出時に行われている耐性遺伝子検査⁴⁾においても宮城県(仙台市を除く)では2019年7月現在で、カルバペネマーゼ遺伝子は検出されていない。これらのことから、宮城県においてはカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(CPE)はまだ定着していないと思われるが、外国人や海外渡航者からの持ち込みや、CPEの検出数が多い地域からの拡散が懸念される。

CTX-M groupの分類においては、CTX-M-9 groupが最も多く検出され、CTX-M-2 groupが最も少ないことは、他の報告と同様の結果となった。しかし、CTX-M-1 groupの検出数が8株(0.8%)と少なかった。調査①では20.7%、2012~2013年に行われた宮城県内のクリニックの調査⁵⁾(調査②)では22.6%、2014~2016年に愛媛県立中央病院での北尾らの調査⁶⁾(調査③)では20.1%となっており、本研究の結果が突出して低いことがわかる。この点については調査を継続し、引き続き状況を把握する必要があると思われる。

ESBL遺伝子型においては、CTX-M-27が46株(47.9%)と最も多く検出され、次いでCTX-M-14が37株(38.5%)であった。この2種類の遺伝子型の検出率は調査①~③の結果より、2010~11年にはM-27が13.1%、M-14が43.5%、2012~13年にはM-27が46.8%、M-14が29.0%、2014~16年にはM-27が42.0%、M-14が35.5%となっており、2012年頃を境にCTX-M-27がCTX-M-14の検出率を上回るようになったと考えられ、本研究でも同様の結果となった。検出数は2株と少ないが、調査①~③で検出されていないCTX-M-23およびCTX-M-65が検出されており、これらの遺伝子型の動向に注意が必要と考えられる。

また、同一検体より2種類以上の薬剤耐性菌が検出された例が8例確認された。そのうち6例は同じタイプの耐性遺伝子を保有しており、このことはヒトの腸管内で薬剤耐性遺伝子を持つプラスミドが異なる菌株間で伝播している可能性を示唆している。今後、これらの菌株についてプラスミド解析等も行う予定である。

薬剤感受性試験では、ESBL産生*E.coli*においてLVFX耐性率が高いことが明らかになった。O抗原別耐性率を比較すると、O25/Og25では97.7%(43/44株)、O86a/Og86では90.9%(10/11株)、Og75では100%(4/4株)と高く、反対にOgGP7では11.1%(1/9株)、Og16では0%(0/4株)、O20でも0%(0/3株)と低

かった。感性株と耐性株の割合にあまり差が見られなかったのはO1/Og1の37.5%(3/8株)のみであったことから、LVFX耐性と*E.coli*O抗原の間には深い関連性があると考えられた。近年、LVFXを初めとするフルオロキノロン系薬に対して耐性を示すESBL産生菌が増加しており、その原因としてSequence Type(ST)131という特定クローンの流行が指摘されている。本研究ではMLST(multilocus sequence typing)を実施していないが、検出されたLVFX耐性株がST131であるか否かについても含めた検討を行いたいと考えている。

本研究ではCTX-M-27産生*E.coli*O25/Og25が数多く検出された。CTX-M型ESBLはCAZと比較してCTXをよく分解することが知られているが、CTX-M-27は240番目のアスパラギン酸がグリシンへ置換されたことにより、CAZの分解効率を上昇させることが報告されている⁷⁾。本研究により、CTX-M-27の87.0%(40/46株)がO25/Og25であり、前述のとおり、O25/Og25の97.7%がLVFX耐性であることから、CTX-M-27産生*E.coli*O25/Og25は他のESBL産生菌に比較し、より多剤耐性である可能性が高いと考えられる。本研究では、このCTX-M-27産生O25/Og25が40株と、薬剤耐性菌全129株の約3分の1を占めていたことから、今後の拡散が懸念されるため、継続的にこれらの薬剤耐性菌を監視する必要があると考える。

5 謝辞

本研究を行うにあたり、検査に同意してくださった方々および保健所の担当者の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) Gilmour,M.W.,Olson,A.B.,Andrysiak,A.K.,Ng,L.K.,Chui,L.:J.Med.Microbiol.,**56**,620-628(2007).
- 2) Iguchi,A.,Iyoda,S.,Seto,K.,Morita-Ishihara,T.,Scheutz,F.,Ohnishi,M.:J.Clin.Microbiol.,**53**,2427-2432(2015).
- 3) Nakane,K.,Kawamura,K.,Goto,K.,Arakawa,Y.:Appl.Environ.Microbiol.,**82**,1818-1827(2016).
- 4) カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)感染症等に係る試験検査の実施について(平成29年3月28日付健感発0328第4号)
- 5) 矢野寿一, 中野竜一, 中野章代, 水野文子:臨床と微生物,**42**,311-316(2015).
- 6) 北尾孝司, 石丸美架, 武田志穂, 高田智世:医学検査,**68**,1-6(2019).
- 7) Bonnet,R.,Recule,C.,Baraduc,R.,Chanal,C.,Sirot,D.,DeChamps,C.,Sirot,J.:J.Antimicrob.Chemother.,**52**,29-35(2003)