

資 料

岐阜県内で分離された腸管出血性大腸菌の基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ遺伝子の保有状況と薬剤感受性試験結果

古田綾子, 野田万希子, 足立知香, 園田智哉, 越 勝男*, 亀山芳彦

要 旨

2008～2021 年度に当所へ搬入のあった腸管出血性大腸菌の代表株 407 株について基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子のスクリーニングと薬剤感受性試験を行った。その結果, ESBL 産生菌と確認されたのは TEM 型と CTX-M-1 group の β-ラクタマーゼ遺伝子が検出された O157 (VT1&VT2) 1 株 (0.2%) のみであり, 薬剤感受性試験において年推移による多剤耐性化の傾向は認められなかった。薬剤耐性遺伝子はプラスミドを介して別の菌株にも伝達可能なことが知られており, 複数の薬剤耐性遺伝子を保有した多剤耐性菌が出現する可能性があるため, 今後もモニタリングを継続する必要がある。

キーワード: 腸管出血性大腸菌 (EHEC), 基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL), 薬剤感受性試験, MLST 解析

1 はじめに

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は, ペロ毒素 (Verotoxin=VT または Shiga toxin=Stx) を産生する大腸菌が原因で引き起こされる感染症であり, 感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律 (感染症法) の 3 類感染症に分類され届出が義務づけられている。本症は無症状や軽い下痢・腹痛などの軽症で済むこともあるが, 溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などを発症し死亡または腎機能や神経学的障害等の後遺症を残す可能性がある疾患である¹⁾。全国で年に EHEC 感染者は 3000 人から 4000 人, 岐阜県内でも過去 10 年間で年に 25～92 人確認されている。

β-ラクタマーゼは β-ラクタム系薬剤を分解する酵素の総称であるが, 近年, 医療現場において基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (Extended-spectrum β-lactamase: ESBL) 産生菌が院内感染の原因として問題視されている。ESBL はセフェム系第 2 世代以降のセファロスポリン系やモノバクタム系の薬剤を分解できる β-ラクタマーゼで, 複数のタイプがある。このうち, 大腸菌で主要なタイプは, いずれも Ambler の分類で Class A β-ラクタマーゼに分類されている TEM 型, SHV 型と, セファロスポリン系薬剤を分解可能な CTX-M 型である。このうち, TEM 型, SHV 型は, 本来 β-ラクタム系抗菌薬の中でもペニシリン系薬剤のみを分解可能なペニシリナーゼであり, 遺伝子変異に

より ESBL として機能するタイプが含まれる²⁾。ESBL 産生遺伝子はプラスミド上に存在することがあり, 別の菌種に伝播していく可能性があるため, 対策が必要である。近年国内で EHEC の ESBL 産生株についての報告^{3,4)}があり, 本県での検出も懸念されるため, 今回 EHEC 保存菌株を用いて ESBL 遺伝子産生菌のスクリーニングと薬剤感受性試験を行った。

2 材料と方法

2.1 供試菌株

2008～2021 年度に当所へ搬入のあった EHEC 729 株の中から, 散發事例及び家族内・集団感染事例の代表菌株の計 407 株 (表 1) を用いた。

2.2 ESBL 遺伝子の PCR スクリーニング

四宮らによる渡邊班地研グループ耐性遺伝子検査プロトコル⁵⁾に従って, TEM 型, SHV 型, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 group, CTX-M-8/25 group の β-ラクタマーゼ遺伝子を対象としたマルチプレックス PCR を実施し, 目的サイズのバンドが検出されるかを判定した。

2.3 薬剤感受性試験

ドライプレート[®]栄研[®] (192 プレート) を用いて (栄研化学), 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), セファゾリン (CEZ), セフォチアム (CTM), セフォ

表1 供試菌株

O群	VTタイプ	年度														計
		2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
O157	VT1&VT2	33	13	15	11	15	13	4	4	10		14	5	4	6	147
	VT2	9	6	6	5	5	10	9	5	13	8	4	8	3	13	104
	VT1&VT2											1			1	
O26	VT1	5	2	4	12	5	7	4	6	5	8	6	3	1	8	76
	VT2						1									1
O111	VT1&VT2							1				1	1		3	
	VT1	1	1			2						1		1	6	
O103	VT1			1	1	1	1		1	1	1	3	3	1	14	
O145	VT1					1				1	1				2	
	VT2				1						2		8		13	
O121	VT2					1	1	3	3		1	1	1	1	12	
その他*, OUT	VT1&VT2			1								1			3	
	VT1				1		1		1		1	5	1	2	13	
	VT2	2	1		1					1	1	3	1	2	12	
計		50	23	27	32	30	34	21	20	31	22	40	31	15	31	407

*その他のO群：O55, O69, O91, O113, O115, O128, O146, O165, O179, O186

タキシム (CTX), CTX/クラブラン酸 (CVA), セフトラジジム (CAZ), CAZ/CVA, セフトリアキソン (CTR), セフピロム (CPR), CPR/CVA, セフェピム (CFPM), セフジニル (CFDN), セフポドキシム (CPDX), CPDX/CVA, セフメタゾール (CMZ), ラタモキシム (LMOX), フロモキシム (FMOX), ファロペネム (FRPM), イミペネム (IPM), メロペネム (MEPM), アズトレオナム (AZT), クラブラン酸アモキシシリン (ACV), スルバクタム/セフォペラゾン (S/C), スルバクタム/アンピシリン (S/A), タゾバクタム (TAZ)/PIPC, ゲンタマイシン (GM), アミカシン (AMK), シプロフロキサシン (CPF), レボフロキサシン (LVFX), ミノサイクリン (MINO), コリスチン (CL), ホスホマイシン (FOM), スルファメトキサゾール/トリメトプリム (ST) の34薬剤である。このうち26薬剤において CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M100-S22 に準拠し、感性 (S) 耐性 (R) を判定した。また FOM については MIC が $256 \geq \mu\text{g/ml}$ の株を耐性 (R) と判定した⁶⁾。

2.4 β-ラクタマーゼ遺伝子のタイプ決定

既報に従い CTX-M-1group は CTX-M-1-F と CTX-M-1-R のプライマー⁷⁾, TEM 型は TEM_T1 と TEM_T2 のプライマー⁸⁾ (824bp) または、2.2 ESBL 遺伝子の PCR スクリーニングで使用した TEM 型プライマー (372bp) を用いてダイレクトシークエンスを実施し、β-ラクタマーゼ遺伝子のタイプを決定した。

2.5 Multilocus sequence typing (MLST) 解析

既報⁹⁾に従い、7 遺伝子 (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) の塩基配列を決定後、MLST データベース (<https://pubmlst.org/>) に照合し、シークエンス型 (ST) を決定した。

3 結果

3.1 2008~2021 年度代表株の ESBL 遺伝子の PCR スクリーニング

407 株の PCR スクリーニングの結果、TEM 型遺伝子を 52 株 (12.8%) から検出した。52 株の内訳を表 2 に示す。そのうち 2008 年度に分離された O157

表2 TEM型遺伝子検出数と検出率

O群	VTタイプ	年度														株数	検出率(%)
		2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021		
O157	VT1&VT2	5*	2		1	2	5	2		1	1				19	10.8	
	VT2			1	1		2	1	1			2			8		
O26	VT1	1	1	1	1	1	1		1					1	8	10.3	
O111	VT1&VT2							1							1	22.2	
	VT1	1													1		
O103	VT1					1				1					2	14.2	
O145	VT2										2		7	2	11	78.6	
O121	VT2												1		1	8.3	
その他, OUT	VT2													1	1	5.5	
計		7	3	2	3	3	9	4	1	3	2	1	10	2	2	52	12.8
検出率 (%)		14.0	13.0	7.4	9.3	10	26.4	19.0	4.8	9.7	9.1	2.5	32.3	13.3	6.5		

*うち1株はCTX-M-1 groupも検出 (菌株No.08-10)

表3 微量液体希釈法結果

耐性パターン	O157	O26	O111	O103	O145	O121	その他, OUT	株数	耐性株の 割合(%)
1剤耐性 ST		1						1	1.9
(R) ABPC	1							1	1.9
2剤(R) ABPC, MINO	2							2	3.8
PIPC, ABPC	11	5	1	1	1			19	36.6
3剤(R) ABPC, MINO, CEZ	1							1	1.9
PIPC, ABPC, ST	5	1			10		1	17	32.6
PIPC, ABPC, MINO	4			1				5	9.6
4剤(R) PIPC, ABPC, ST, GM						1		1	1.9
PIPC, ABPC, ST, S/A	1							1	1.9
PIPC, ABPC, MINO, CEZ		1						1	1.9
PIPC, ABPC, MINO, S/A			1					1	1.9
5剤(R) PIPC, ABPC, ST, CEZ, TAZ/PIPC	1							1	1.9
10剤(R) PIPC, ABPC, MINO, CEZ, CAZ, CTX, CTRX, CFDN, CPDX, AZT	1							1	1.9
計	27	8	2	2	11	1	1	52	100

VT1&VT2 の1株 (菌株 No.08-10) から CTX-M-1 group のβ-ラクタマーゼ遺伝子も検出した。SHV 型やその他の CTX-M group の遺伝子は検出されなかった。血清群別では、O145 が15株中11株 (78.6%) と TEM 型遺伝子の検出率が高かった。また年度別では、2019 年 が31株中10株 (32.3%) と最も高かった。

3.2 薬剤感受性試験

ESBL 遺伝子のスクリーニングで何れかのβ-ラクタマーゼ遺伝子が検出された52株の薬剤感受性試験結果を表3に示す。1株 (菌株 No. 08-49) を除いた51株がペニシリン系薬剤である PIPC または ABPC に耐性を示した。そのうち1株 (菌株 No.08-10) では、第2世代以降のセファロスポリンを含む10剤に耐性を示し、CTX, CAZ, CPR 及び CPDX において CVA 添加ウェルと比較すると、クラブラン酸添加による感敏化が認められ、ESBL 産生菌であることが示唆された。ホスホマイシン、カルバペネム系及びフルオロキノロン系薬剤に耐性を示した株はなかった。最も薬剤耐性パターンとして多かったのはペニシリン系薬剤 PIPC, ABPC の2剤に耐性の株で、52株中19株 (36.6%) だった。また、菌株 No.08-49 はペニシリン系薬剤に耐性はなく ST 合剤にのみ耐性を示した。β-ラクタム系薬剤以外での耐性は ST 耐性21株 (40.4%)、MINO 耐性11株 (21.2%) であった。分離年度と耐性を示した薬剤数の関係を比べると、10剤耐性株は2008年度分離株、5剤耐性株は2014年度分離株、4剤耐性株は2008年度・2013年度・2019年度の分離株であり年推移による多剤耐性化の傾向は認めなかった。

3.3 β-ラクタマーゼ遺伝子のタイプ決定

菌株 No.08-10 で検出されたβ-ラクタマーゼ遺伝子のタイプ決定を行った結果、CTX-M-1 group のβ-ラク

タマーゼは CTX-M-15 (coverage 100%, identity 99.9%), TEM 型は ESBL ではなくペニシリナーゼのタイプである TEM-1B (coverage 100%, identity 99.6%) と一致した。また、TEM 型のβ-ラクタマーゼ遺伝子を検出したがペニシリン系薬剤に耐性の示さなかった菌株 No.08-49 は、TEM_T1 と TEM_T2 (824bp) のプライマーでは増幅を認めず全長を得ることはできなかったが、TEM-410F と TEM-781R のプライマー (372bp) での増幅は認め TEM-1B と一致した (coverage 43.2%, identity 99.9%)。

3.4 MLST 解析

CTX-M-15 の ESBL を産生していることが示された菌株 No.08-10 (O157 VT1&VT2) について MLST 解析を行ったところ ST11 であった。

4 考察

今回 2008~2021 年度に当所に搬入された EHEC の代表株 407 株の ESBL 遺伝子のスクリーニングと薬剤感受性試験を行ったところ、ESBL 産生が示唆されたのは CTX-M 型β-ラクタマーゼ遺伝子が検出された1株のみであった (検出率 0.2%)。国内における ESBL 産生 EHEC 株は、2012 年に山口ら¹⁰⁾の報告で77株中1株 (検出率 1.3%)、2018 年に岩佐ら¹¹⁾の報告で456株中4株 (検出率 8.8%)、津曲ら¹²⁾が147株中2株 (検出率 1.4%) で検出が報告されており、当県の検出率はこれらの報告と比較すると低かった。また、TEM 型β-ラクタマーゼ遺伝子の血清群や分離年度ごとの検出率は、2019 年度の O145 VT2 以外に高い検出率を示す特定の血清群や年度は認められず、耐性を示す薬剤数が年推移によって増加する傾向も認められなかった。2019 年度の O145 VT2 の7株については、共通感染源

は認められなかったものの同時期に複数の事例が集積しており、そのうち6株では遺伝子型も一致していたことから、同一のESBL産生株である可能性がある。同様に2008年度と2013年度のO157 VT1&VT2各5株についても、一部遺伝子型が一致している株が存在しており、β-ラクタマーゼ遺伝子の検出率を見る際には注意が必要と考えられる。

検出されたESBLのタイプに注目すると、既報ではβ-ラクタマーゼのタイプまでは決定されていない株もあるが、いずれの株からもCTX-M型のβ-ラクタマーゼが検出されており^{10,11,12)}、今回の調査と同様であった。今回検出されたCTX-M-15 β-ラクタマーゼはCTX-M-1 groupに含まれ、臨床材料から検出されるESBL産生大腸菌の主要タイプであり¹³⁾、臨床分離株で検出率が高いことによりEHECへも伝達されるリスクが高まっていると考えられる。また、TEM型遺伝子が検出された52株のうち50株は、セフェム系薬剤のうちペニシリン系薬剤であるPIPCとABPCのみ耐性が認められたことから、β-ラクタマーゼのタイプ決定は実施していないものの、ESBLではなくペニシリナーゼのタイプであると考えられる。また、PIPCとABPCに耐性が認められなかった菌株No.08-49のTEM型β-ラクタマーゼ遺伝子配列は一部TEM-1Bと一致していたが、全長の配列が得られなかったことから、ペニシリナーゼとして機能するために必要な領域の欠損や変異があった可能性がある。

今回検出されたESBL産生EHEC(菌株No.08-10)はO157:H7 VT1&VT2であり、MLSTの結果ST11であることが判明した。ST11は臨床から検出されるO157の主要STであり¹⁴⁾、系統上は特殊な菌株でないかと推定されるが、保有病原因子等に特徴がないか、より詳細な解析が必要である。

2011年にドイツ北部でのEHEC(O104:H4)のoutbreakはESBL産生菌であったことが確認されており¹⁵⁾、EHECにおける薬剤耐性株の増加が懸念される。今回のESBL産生菌の検出は407株中1株と検出率は高くはなく、EHEC治療に用いられることの多いフルオロキノロンやホスホマイシンに耐性を示した株はなかった。しかしESBL遺伝子をはじめとする薬剤耐性遺伝子はプラスミドを介して伝達されることがあり、多剤耐性菌の出現するおそれもあるため、今後もモニタリングを継続することが重要である。

謝 辞

本調査の実施にあたり、検体収集等にご協力いただきました県保健所の関係各位にお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：〈特集〉腸管出血性大腸菌感染症 2022年3月現在、病原微生物検出情報 (IASR), 43(5), 103-104, 2022.
- 2) 石井良和：基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL), モダンメディア, 53(4), 98-104, 2007.
- 3) 菊池孝司, 上野裕之, 泊賢太郎, 小堀すみれ, 嘉悦明彦, 宮崎元伸：Cefotaxime 感性および耐性株が混在した保育園による腸管出血性大腸菌 O121 集団感染, 感染症誌, 88, 430-437, 2014.
- 4) 富岡義裕, 伊藤恵, 奈良岳志, 松本昌平：Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) 産生 entero-hemorrhagic *Escherichia coli* [EHEC (O157:H7)] が原因の腸管出血性大腸菌感染症の一例, J Jpn Soc Intensive Care Med, 27, 425-426, 2020.
- 5) 四宮博人：食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究 分担課題「地研ネットワークを利用した食品およびヒトから分離されるサルモレラ, 大腸菌, カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査」, 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)平成31年～令和元年度分担研究報告書, 9-37, 2020.
- 6) 検査法ガイド等作成委員会・耐性菌検査法ガイド作成作業部会：耐性菌検査法ガイド, 日本臨床微生物学雑誌, 27 (Supplement 3), 131-132, 2017.
- 7) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, et al.: PCR classification of CTX-M-type β-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, Antimicrob Agents Chemother, 50(2), 791-795, 2006.
- 8) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y : A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan, FEMS microbial Lett, 184, 53-56, 2000.
- 9) Enterobase: Protocols used for MLST of *Escherichia coli* and *Shigella spp.*, <http://enterobase.readthedocs.io/en/latest/mlst/mlst-legacy-info-ecoli.html>
- 10) 山口友美, 木村葉子, 矢崎知子, 後藤郁男, 畠山敬, 沖村容子：基質特異性拡張型β-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,

- 宮城県保健環境センター年報, 30, 27-30, 2012.
- 11) 岩佐奈津美, 本田己喜子, 中牟田啓子: 福岡市においてヒトから分離された腸管出血性大腸菌の薬剤耐性状況 (2006~2016), 日本食品微生物学会雑誌, 35(3), 154-158, 2018.
 - 12) 津曲洋明, 水流奈己, 阿波野祥司, 吉野修司, 元明秀成: 宮崎県で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26, O157 の薬剤感受性と分子生物学的解析, 宮崎県衛生環境研究所年報, 29, 59-64, 2018.
 - 13) Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH: Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective, Clin Microbiol Infect, 18(6), 7646-655, 2012.
 - 14) 馬場啓聡: 志賀毒素産生性大腸菌臨床分離株の分子疫学的研究, 博士論文 11301 甲第 18539 号, 東北大学, 2019.
 - 15) Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, Heiden M: Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany, N Engl J Med, 365, 1771-80, 2011.

Extended-Spectrum Beta-Lactamase Gene Prevalence and Drug Susceptibility Test Results of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Isolated in Gifu Prefecture

Ayako FURUTA, Makiko NODA, Chika ADACHI, Tomochika SONODA,
Katsuo KOSHI* and Yoshihiko KAMEYAMA

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:

1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan

**1727-1, Hachimanncho-hatune, Gujo, Gifu 501-4232, Japan*